

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Laboratório de Enzimologia e Proteômica

**Análise proteômica do secretoma de *Leishmania infantum* e  
ensaios preliminares para a descoberta de biomarcadores da  
Leishmaniose Visceral Canina**

Micheline Soares

Ouro Preto  
2012

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Laboratório de Enzimologia e Proteômica

**Análise proteômica do secretoma de *Leishmania infantum* e  
ensaios preliminares para a descoberta de biomarcadores da  
Leishmaniose Visceral Canina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, Área de concentração em Genômica e Proteômica.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

Ouro Preto

2012

S676a

Soares, Micheline.

Análise proteômica do secretoma de *Leishmania infantum* e ensaios preliminares para a descoberta de biomarcadores da Leishmaniose visceral canina [manuscrito] / Micheline Soares - 2012.

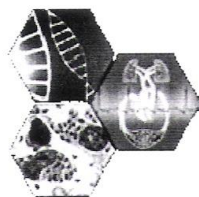
xviii, 102f.: il., color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Área de concentração: Genômica e Proteômica.

1. Secretoma - Teses. 2. *Leishmania infantum* - Teses. 3. Leishmaniose visceral - Teses. 4. Biomarcadores - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)



Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

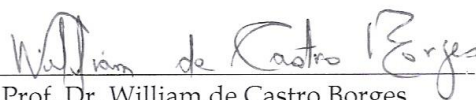


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

**“Análise proteômica do secretoma de *Leishmania infantum* e ensaios preliminares para a descoberta de biomarcadores da Leishmaniose Visceral Canina”**

Aos oito dias do mês de fevereiro de 2012, às 14h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Micheline Soares. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... APROVAR ..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. William de Castro Borges  
Presidente



Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota  
Examinadora (UFOP)



Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni  
Examinador (UNAERP)

DATA DA DEFESA: 08/02/2012

## **Colaboradores**

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis <sup>I</sup>

Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade <sup>II</sup>

Dra. Daniela de Melo Resende <sup>I</sup>

M.s Bruno Mendes Roatt <sup>I</sup>

M.s Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares <sup>I</sup>

M.s Samuel Leôncio Braga <sup>I</sup>

I – Laboratório de Imunopatologia NUPEB/UFOP

II – Laboratório de Enzimologia e Proteômica NUPEB/UFOP

Dedico este trabalho à minha família;

Meus pais, Edmilson e Maria da Conceição, pelo amor, força e compreensão;

Minhas avós, Nice e Amélia (*in memoriam*), pela demonstração de força e superação;

Minha irmã, Sheila, pela amizade e carinho.

E ao meu marido, Samuel, pelo amor, amizade e companheirismo, principalmente nos momentos difíceis.

## **Agradecimentos**

A Deus, que mesmo nos momentos em que eu não acreditava, não me abandonou.

Ao meu marido Samuel, pelo amor, carinho, apoio e compreensão, nos momentos mais difíceis você esteve ao meu lado, quando nem eu acreditava em mim mesma você não desistiu. Obrigada por caminhar comigo nestes sete anos e por nossa filha que está vindo. Eu te amo.

Aos meus pais, minhas avós e minha irmã, pelo amor, carinho, apoio e confiança durante toda minha vida. Sem vocês nunca teria conseguido. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao professor William de Castro Borges, pela orientação, oportunidade e compreensão. Agradeço pela confiança, paciência e auxílio. Obrigada pelo apoio e incentivo, eles foram essenciais nesta caminhada. Eu não teria tido um orientador melhor. Aprendi muito com você.

Ao professor Alexandre Barbosa Reis, pela co-orientação neste projeto. Obrigada pela força e incentivo, mesmo de longe.

Aos amigos do LEP, pelo apoio, amizade e conforto. E claro, pelos momentos de descontração. Agradeço ao Leandro e Jonatan pela ajuda nos experimentos.

Ao técnico do LEP, José Henrique Braga Fortes, pela dedicação aos materiais e problemas do laboratório, para uma melhor realização dos experimentos.

Aos amigos do LIMP, em especial Bruno, Rodrigo e Samuel, pela ajuda nos experimentos.

Às minhas comadres, Carol, Kátia e Iara, pela convivência por todos estes anos.

Aos amigos da República K-Zona que me acolheram. Obrigado pela amizade e companheirismo.

Ao Laboratório Multiusuário do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas pelo uso do microscópio Leica DM5000B acoplado a microcâmera Leica DFC340FX.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/NUPEB/UFOP pela oportunidade fornecida para o desenvolvimento desta dissertação.

A CAPES pela bolsa de estudos que propiciou a minha dedicação de forma exclusiva a este projeto.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.



“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes”.

*Albert Schweitzer*

## Sumário

Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvi
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
1 – Introdução.....	1
2 - Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 – Leishmanioses .....	4
2.2 - Leishmaniose Visceral Canina.....	5
2.3 – Testes diagnósticos para LVC.....	7
2.4 – Vacinas contra leishmaniose.....	8
2.5 – Proteômica.....	10
2.6 – Importância das proteínas secretadas no contexto da relação parasito- hospedeiro.....	12
3 – Objetivos.....	15
3.1 – Objetivo geral.....	15
3.2 – Objetivos específicos.....	15
4 – Metodologia.....	16
4.1 – Cepas de <i>Leishmania</i> .....	16
4.2 - Caracterização da espécie de <i>Leishmania</i> por PCR-RFLP.....	16
4.3 - Obtenção e manutenção da cepa <i>Leishmania infantum</i> .....	18
4.4 - Cultura de <i>Leishmania</i> e obtenção das proteínas secretadas e do extrato total.....	19
4.5 - Análise morfológica dos parasitos durante o período de cultivo.....	22
4.6 – Citometria de fluxo.....	22
4.7 - Eletroforese e <i>Western blotting</i> .....	23
4.8 – Soros de cães.....	23
4.9 – Digestão das proteínas e espectrometria de massas.....	24
4.10 - Anotação das proteínas identificadas no secretoma de <i>L.infantum</i> .....	27
4.11 - Obtenção das proteínas secretadas por <i>L. amazonensis</i> e <i>Western     blotting</i> .....	27
5 – Resultados.....	28

5.1 - Triagem molecular utilizando PCR-RFLP para caracterização das espécies de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	28
5.2 - Análise morfológica em diferentes condições de cultivo para obtenção do secretoma de <i>L. infantum</i> .....	29
5.3 – Determinação da viabilidade celular durante o cultivo de <i>L. infantum</i> por citometria de fluxo.....	30
5.4 - Análise eletroforética em gel unidimensional para avaliação do perfil proteico associado ao secretoma de <i>L. infantum</i> .....	33
5.5 - Identificação dos constituintes do secretoma de <i>L. infantum</i> por espectrometria de massas.....	34
5.6 – Imunoproteômica.....	43
5.6.1 - Busca de marcadores para prognóstico e diagnóstico da infecção por <i>L. infantum</i> .....	43
5.6.2 - O secretoma de <i>L. amazonensis</i> como fonte alternativa de antígenos para o prognóstico e diagnóstico da LVC.....	44
6 – Discussão.....	46
7 – Conclusão.....	56
8 – Perspectivas.....	57
9 – Referências.....	58
10 – Anexos.....	72

## Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	4
Figura 2: Manifestações clínicas de cães sintomáticos portadores de leishmaniose visceral.....	6
Figura 3: Diagrama de Venn comparando os genomas de <i>L. brasiliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> .....	11
Figura 4: A) Formação de microvesículas a partir da bolsa flagelar e membrana plasmática de <i>Leishmania</i> . B) Exossomos de <i>Leishmania</i> são liberados no citoplasma de macrófagos.....	13
Figura 5: Exossomos de <i>Leishmania</i> liberam suas proteínas na célula hospedeira e perturbam a sinalização celular do hospedeiro.....	14
Figura 6: Diagrama referente à técnica de PCR-RFLP empregada na caracterização de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	17
Figura 7: Diagrama referente ao isolamento da cepa de <i>L. infantum</i> (MHOM/BR/1974/PP75) empregada no experimento para obtenção das proteínas secretadas.....	19
Figura 8: Diagrama ilustrando a expansão da cultura de <i>L. infantum</i> e obtenção das proteínas secretadas.....	21
Figura 9: Delineamento experimental ilustrando as principais etapas para obtenção do secretoma de <i>L. infantum</i> .....	26
Figura 10: Produtos de amplificação por PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> após restrição por Hae III.....	28
Figura 11: Análise morfológica do concentrado de parasitos durante o cultivo para obtenção de proteínas secretadas.....	30
Figura 12: Análise de viabilidade dos parasitos por citometria de fluxo durante o cultivo de <i>L. infantum</i> .....	32
Figura 13: Perfil eletroforético unidimensional dos secretomas e extrato total de <i>L. infantum</i> .....	33
Figura 14: Categorização biológica das proteínas encontradas de acordo com <i>GeneDB</i> .....	38
Figura 15: Quantidade relativa de abundância ( <i>emPAI</i> ) das proteínas identificadas na fração 6h pH7.2.....	39
Figura 16: Quantidade relativa de abundância ( <i>emPAI</i> ) das proteínas identificadas na fração 6h pH7.2, excluindo-se a categoria citoesqueleto.....	40
Figura 17: Reatividade do secretoma de <i>L. infantum</i> frente aos soros de animais portadores de diferentes formas clínicas da LVC.....	43
Figura 18: Perfil eletroforético unidimensional do secretoma de <i>L. amazonensis</i> .....	44
Figura 19: Reatividade do secretoma de <i>L. amazonensis</i> frente aos soros de animais portadores de diferentes formas clínicas da LVC.....	45
Figura Suplementar 1.....	72

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Amostras de referência de <i>Leishmania</i> sp.....	16
Tabela 2: Proteínas identificadas por espectrometria de massas e categorizadas de acordo com o processo biológico ao qual pertencem.....	35
Tabela 3: Proteínas analisadas pelos algoritmos <i>SignalP</i> , <i>Sigcleave</i> , <i>SecretomeP</i> , <i>TMHMM</i> e <i>WoLF PSORT</i> .....	41
Tabela Suplementar 1.....	73

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

°C - Graus Celsius  
% - Percentual  
µg - Micrograma  
µL - Microlitro  
ACN - Acetonitrila  
ATP – Adenosina trifosfato  
BOD - *Biochemical Oxygen Demand*  
BCIP – *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*  
CCA – Centro de Ciência Animal  
CHAPS - *3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*  
COX - Ciclooxygenase  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
DTT- Ditioneitol  
eATP – ATP extracelular  
ef-1 $\alpha$  – fator de elongação 1 alfa  
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
emPAI - *Exponentially modified protein abundance index*  
FML – Ligante de fucose e manose  
GTP – Guanina trifosfato  
HCl – Ácido clorídrico  
HSP – Proteína de choque térmico  
IFAT - *Indirect Immunofluorescence Antibody Test*  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IL-10 – Interleucina 10  
iNOS - óxido nítrico sintase induzível  
kDa - Kilodáton  
kDNA - DNA do cinetoplasto  
Kg - Kilograma  
KMP-11 – Proteína de membrana cinetoplastídeo 11  
LACK – Receptor de proteína kinase C ativada  
LCR1 – Antígeno flagelar de *L. chagasi*  
LiESAP – Antígenos secretados e excretados por promastigotas de *L. infantum*  
LIMP - Laboratório de Imunopatologia  
LIT - *Liver infusion tryptone*  
LPG - Lipofosfoglicano  
LV – Leishmaniose Visceral  
LVC – Leishmaniose Visceral Canina  
LVH – Leishmaniose Visceral Humana  
M - Molar  
mA - Miliampere  
Mb - Megabase  
MDP – Dipeptídeo Muramil  
mg - Miligrama  
min - Minutos  
mM - Milimolar

**mm** - Milímetro  
**MS** – Ministério da Saúde  
**NaCl** – Cloreto de Sódio  
**NBT** – *Nitro-blue tetrazolium chloride*  
**NdK** - Nucleosídeo difosfato quinase  
**NDP** – Nucleosídeo difosfato  
**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B  
**nL** - Nanolitro  
**NNN** - Meio de cultura Novy McNeal e Nicolle  
**NTP** – Nucleosídeo trifosfato  
**OMS** - Organização Mundial de Saúde  
**pb** - Pares de bases  
**PBS** - *Phosphate buffered saline*  
**PCLV** – Programa de controle da LV  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase  
**pH** - Potencial hidrogeniônico  
**PG** – Prostaglandina  
**PGD<sub>2</sub>** – Prostaglandina D<sub>2</sub>  
**PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
**PGF<sub>2 $\alpha$</sub>**  – Prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>   
**PVDF** – *Polyvinylidene difluoride*  
**RFLP** - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição  
**RPMI** – Meio de cultura  
**SDS** – Dodecil sulfato de sódio  
**SDS-PAGE** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS  
**TA** – Temperatura ambiente  
**TFA** – Ácido tricloroacético  
**TGF- $\beta$**  – Fator transformador de crescimento beta  
**TOP** – Thimet oligopeptidase  
**TXN** - Triparedoxina  
**UTP** – Uracila trifosfato  
**p:v** – Peso/volume  
**v:v** – Volume/volume  
**UFOP** – Universidade Federal de Ouro Preto  
**WHO** - World Health Organization - Organização Mundial de Saúde

## Resumo

As leishmanioses constituem um grupo heterogêneo de doenças que abrangem áreas tropicais e subtropicais, sendo endêmicas em 88 países com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas expostas ao risco. Por ano, cerca de 1.500.000 casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 casos de leishmaniose visceral (LV) são relatados. Os cães, os principais reservatórios domésticos, são considerados o principal elo na cadeia de transmissão da LV. A partir da disponibilidade dos dados de sequenciamento dos genomas de algumas espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*), ferramentas na área da proteômica podem ser empregadas para a identificação de novas proteínas com potencial para o diagnóstico, prognóstico e/ou o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose. O foco do presente estudo constituiu a caracterização molecular do secretoma da espécie *L. infantum*, utilizando-se de uma abordagem proteômica. Promastigotas em fase *log* de crescimento foram submetidos ao cultivo sob duas condições experimentais. A primeira, nas condições normais de cultivo de promastigotas (pH 7.2 e temperatura de 26°C) e, para a segunda, utilizando condições para mimetizar o microambiente de um fagolisossomo (pH 5.5 e temperatura de 35°C). A homogeneidade do secretoma foi avaliada a partir da contagem de parasitos viáveis, durante diferentes tempos de cultivo, empregando marcação por iodeto de propídeo e citometria de fluxo. A técnica de marcação revelou que durante 8h de cultivo a percentagem de parasitos viáveis manteve-se aproximadamente 94%. A fração do sobrenadante de cultura, obtido durante 6h em pH 7.2, foi submetida à digestão em solução utilizando tripsina. Os peptídeos resultantes foram separados usando cromatografia de fase reversa e detectados para fragmentação a partir de uma interface acoplada ao espectrômetro de massas operando via *electrospray*. Após busca de homologia em bancos de dados foram identificadas 135 proteínas, as quais foram classificadas em 9 categorias funcionais e 1 hipotética. Dados sobre abundância relativa permitiram concluir que o secretoma de *L. infantum* está representado por basicamente três categorias (1) metabolismo de nucleotídeos, (2) metabolismo de carboidratos e (3) outros processos. Sessente e três proteínas foram submetidas à análises de bioinformática para predição de sinais moleculares indicativos de secreção, por meio de vias clássicas e não clássicas. Cerca de 50% das proteínas investigadas são potencialmente secretadas, das quais, 30% atingem o meio extracelular por vias não clássicas. Soros de animais naturalmente infectados, portadores de diferentes formas clínicas da LVC, foram utilizados para testar a imunogenicidade associada aos secretomas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Experimentos de *Western blotting* mostraram que ambas as



preparações são úteis na identificação de animais portadores de LVC. Além disso, as mesmas frações podem ser utilizadas na discriminação de animais sintomáticos, daqueles portadores de outras formas clínicas da doença. Coletivamente, a caracterização molecular do secretoma de *L. infantum* e os ensaios preliminares de imunoproteômica abriram novas possibilidades de investigação relacionadas ao tratamento, prognóstico e diagnóstico da LVC.

## Abstract

Leishmaniasis constitutes a heterogeneous group of illnesses reaching tropical and subtropical areas worldwide. They are endemic in 88 countries where approximately 12 million people are affected and additional 350 million are exposed to the risk of infection. Annually, around 1.500.000 cases of tegumentary leishmaniasis and 500.000 cases of the visceral type (LV) are reported. Dogs, the principal domestic reservoirs, are considered the most important elements for the transmission of LV. The availability of genomic data for some *Leishmania* species (*L. major*, *L. infantum* and *L. braziliensis*) allowed the use of proteomic tools for the identification of novel proteins as targets for the diagnosis, prognosis and/or development of new vaccine preparations against leishmaniasis. The focus of the present investigation constituted the molecular characterization of the *L. infantum* secretome, using proteomic approaches. Promastigotes, under logarithmic phase of growth, were submitted to two different culture conditions. In the first, a regular promastigote culture was employed (pH 7.2 and temperature 26°C) and for the second, it was intended to simulate the parasite's habitat inside the phagolysosome's microenvironment (pH 5.5 and temperature 35°C). The homogeneity of the secretome was evaluated through the counting of viable parasites, cultivated for different periods, using propidium iodide and flow cytometry. The labeling technique revealed that during 8h in culture, the percentage of undamaged parasites was maintained around 94%. The culture supernatant, obtained during 6h in pH 7.2, was conditioned to in solution digestion using trypsin. The resulting peptides were detected and fragmented using reversed-phase chromatography, interfaced with a mass spectrometer operating via electrospray. After database searching, 135 proteins were identified and subsequently classified into 9 functional categories plus 1 hypothetical. The relative abundance index for each of the components allowed conclusion that the *L. infantum* secretome is mainly represented by three categories (1) nucleotide metabolism, (2) carbohydrate metabolism and (3) other processes. Sixty three proteins were submitted to bioinformatic analyses for the prediction of molecular signals indicative of secretion through classic and non-classic pathways. Approximately 50% of the investigated molecules are potentially secreted, of which, 30% reach the extracellular milieu using non-classic pathways. Sera of naturally infected animals, carriers of differing clinical forms of LVC, were used to test the immunogenicity associated to the secretomes of *L. infantum* and *L. amazonensis*. Western blotting experiments revealed that both preparations could be used for the identification of animal carriers of LVC. Moreover, the same preparations were useful to

discriminate symptomatic animals among those exhibiting other clinical forms of the disease. Collectively, the molecular characterization of the *L. infantum* secretome and the preliminary immunoproteomic assays opened up new research avenues related to the treatment, prognosis and diagnosis of LVC.

## 1 - Introdução

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida* (Ross, 1903). Os parasitos são transmitidos aos hospedeiros por insetos denominados flebotomíneos, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Lainson & Shaw, 1987).

Atualmente as infecções causadas por *Leishmania* sp. são endêmicas em 88 países, com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas expostas ao risco. A cada ano ocorrem 1.500.000 casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 casos de leishmaniose visceral (Ashford, 2000; WHO, 2010). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2005). Dentre os países da América Latina, o Brasil contabiliza aproximadamente 90% dos casos diagnosticados com a doença visceral (Arias *et al.*, 1996, Desjeux, 2004).

Os principais hospedeiros vertebrados do parasito são o homem, o cão e roedores. Destes, o cão é considerado o principal elo na cadeia de transmissão da LV por ser encontrado em todos os focos relacionados à doença humana (Deane & Deane, 1954; Molina *et al.*, 1994; Giunchetti *et al.*, 2006). No Brasil, a leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada mais importante que a doença humana, devido à basicamente dois fatores: (i) possui uma maior prevalência, para cada caso humano são encontrados mais de 10 casos caninos; (ii) o grande contingente de animais assintomáticos com alto parasitismo cutâneo, os quais podem ser fonte de infecção para o inseto vetor (Molina *et al.*, 1994; Palatnik-de-Souza *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2009).

A LVC pode se manifestar de diferentes formas clínicas. Cães assintomáticos não apresentam sinais clínicos. Cães oligossintomáticos apresentam sinais moderados como perda de peso, adenopatia linfóide e pêlo opaco. Cães sintomáticos apresentam intenso parasitismo cutâneo ocasionando alopecia, dermatite furfurácia, úlceras e hiperqueratose. Ceratoconjuntivite, onicogribose, paralisia dos membros posteriores, emagrecimento e caquexia são também comuns nos animais sintomáticos e geralmente levam o cão a óbito. (Deane & Deane, 1955; Mancianti, 1988; Abranches *et al.*, 1991; Reis, 2001; Reis *et al.*, 2006a-b; Giunchetti *et al.*, 2006). Os cães são considerados os principais reservatórios urbanos do parasito, apresentando uma posição de destaque na epidemiologia da doença, devido à sua proximidade com o homem seja no ambiente doméstico ou peridoméstico (Grimaldi & Tesh, 1993; Giunchetti *et al.*, 2006). Considerando estes fatores, o controle da

LVC torna-se necessário, pois a diminuição dos reservatórios levaria à redução da taxa de infecção em humanos.

O controle da LV baseia-se em ações que envolvem o tratamento de casos humanos, o combate ao vetor e a eutanásia de cães soropositivos (Grimaldi & Tesh, 1993; Ministério da Saúde, 2003). O tratamento quimioterápico da LVC não é recomendado pela OMS e não é permitido pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2003). Além disso, existem dificuldades no diagnóstico da LVC, devido à baixa sensibilidade de técnicas sorológicas convencionais para a identificação de cães infectados; principalmente dos assintomáticos (Palatnik-de-Souza *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2009). Nas últimas décadas, vários grupos de pesquisa têm despendido esforços na elaboração de vacinas que sejam eficazes e que possam bloquear o ciclo de transmissão da doença (Dunan *et al.*, 1989; Genaro, 1993; Mayrink *et al.*, 1996; Mohebbali *et al.*, 1998; Ramiro *et al.*, 2003; Lemesre *et al.*, 2005; Saldarriaga *et al.*, 2006; Giunchetti *et al.*, 2008). Entretanto, até o momento não existe uma vacina comprovadamente eficaz e aprovada pelo Ministério de Saúde para fins imunoproliféricos (Palatnik-de-Souza *et al.*, 2001; Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008; Palatnik-de-Souza, 2008; Reis *et al.*, 2010).

A partir da disponibilidade de utilização dos dados de sequenciamento do genoma de algumas espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*; Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007) ferramentas na área da proteômica vem sendo empregadas para a identificação de novas proteínas com potencial para o diagnóstico e/ou desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose. Experimentos de imunoproteômica podem ainda fornecer um inventário geral da antigenicidade associada ao proteoma de patógenos e determinar o padrão de especificidade da resposta imune direcionada a eles (Forgber *et al.*, 2006). Entretanto, o sucesso de uma abordagem proteômica baseia-se primariamente na escolha e isolamento do subproteoma a ser investigado (Dreger, 2003).

Parasitas do gênero *Leishmania* são internalizados por células do sistema mononuclear fagocitário, sendo capazes de sobreviver dentro dos macrófagos; apesar das condições extremas dos vacúolos fagolisossomais. Este mecanismo de evasão pode estar relacionado aos processos de secreção de proteínas neste microambiente. O secretoma de *Leishmania* é, portanto, capaz de exercer um papel essencial na manutenção da infecção e pode contribuir para a modulação da resposta imune celular (Chenik *et al.*, 2006; Silverman *et al.*, 2008).

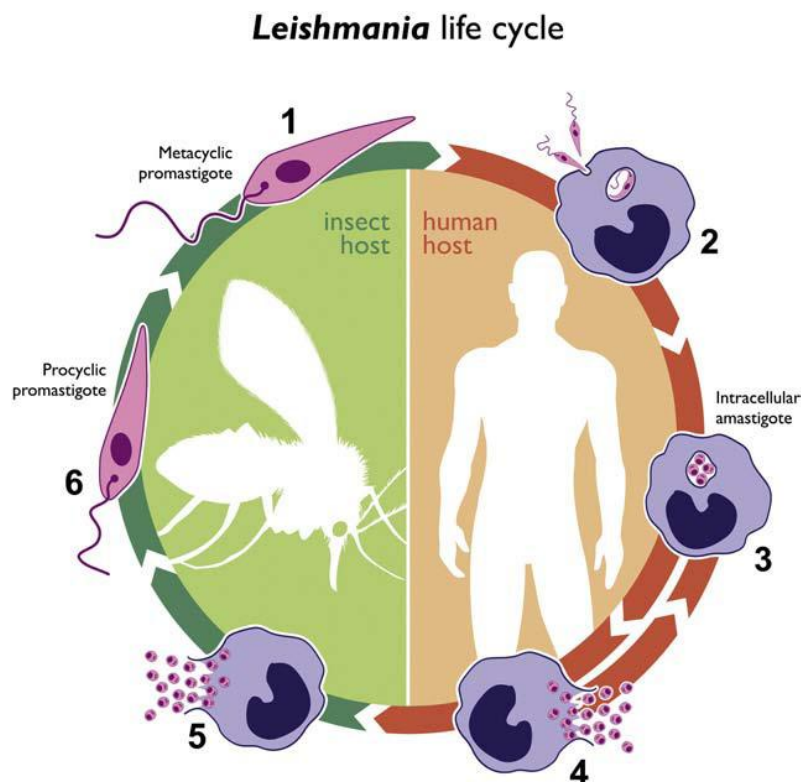
Considerando a relativa escassez de estudos envolvendo proteínas secretadas por *Leishmania* (Chenik *et al.*, 2006; Silverman *et al.*, 2008; Cuervo *et al.*, 2009), o presente

estudo visa contribuir de maneira específica com a caracterização e importância do secretoma de *L. infantum*. Desta forma, este trabalho visa estabelecer uma relação entre imunogenicidade e prognóstico da doença, bem como rastrear biomarcadores que possam ser utilizados em uma abordagem biotecnológica, para elaboração de vacinas e/ou aprimoramento das técnicas sorológicas convencionais empregadas para detecção do parasito.

## 2 - Revisão de Literatura

### 2.1 - Leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo heterogêneo de doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, cuja transmissão ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos. Estas podem infectar desde o homem a animais silvestres e domésticos (Desjeux, 2004). As formas promastigotas, inoculadas através da picada da fêmea, são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário e se diferenciam em formas amastigotas no fagolisossomo (Peters & Sacks, 2006). As amastigotas interiorizadas sofrem divisão binária e rompem a célula, podendo invadir outros macrófagos, células dendríticas e até mesmo fibroblastos (Naderer & Mcconville, 2008). O ciclo de vida do parasito pode ser observado na **Figura 1**.



**Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania*.** A forma infectiva da *Leishmania*, promastigota metacíclica (1), é transmitida pela picada da fêmea de flebotomíneo infectada durante o repasto sanguíneo. Promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelos macrófagos (2). Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, as formas promastigotas se transformam em amastigotas (3) que se multiplicam por fissão binária, lisam os macrófagos e podem infectar outras células fagocíticas mononucleares (4). Durante o repasto sanguíneo, os flebotomos ingerem macrófagos infectados (5); no trato digestório do inseto as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas (forma proliferativa) e migram para a probóscide como formas promastigotas metacíclicas continuando o ciclo (Cuervo *et al.*, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde as leishmanioses podem ser divididas em quatro formas clínicas: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea é uma doença de baixa gravidade, a forma cutânea difusa apresenta aspecto hanseniforme e a forma mucocutânea pode causar sérias lesões no maciço facial. A LV é a mais devastadora das formas clínicas e pode estar associada à febre irregular de longa duração, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, epistaxe, hipergamaglobulinemia, hematêmese, emagrecimento e debilidade progressiva (Alencar & Neves, 1982).

Atualmente estas infecções são endêmicas em 88 países com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas expostas ao risco. A cada ano ocorrem 1.500.000 casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (Ashford, 2000; WHO, 2010). A LV possui ampla distribuição geográfica, estando presente na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2005). O Brasil é responsável por aproximadamente 90% dos casos relacionados à doença na América Latina (Arias *et al.*, 1996, Desjeux, 2004). Até a década de 80, a LV era considerada uma doença de áreas rurais e pobres. No entanto, inúmeros fatores como o desmatamento, a migração para centros urbanos, as mudanças climáticas, a adaptação do vetor ao ambiente doméstico, e, em especial, a participação de animais de peridomicílio no ciclo de transmissão da doença, contribuíram para o aumento da LV em grandes centros urbanos (Reithinger & Davies, 2002; Desjeux, 2004; Cardenas *et al.*, 2008).

## **2.2 - Leishmaniose Visceral Canina**

Dentre os animais envolvidos na difusão da LV, o cão é encontrado em praticamente todos os focos da doença humana representando o principal elo na cadeia de transmissão da LV (Deane & Deane, 1955; Baneth *et al.*, 2008). Do ponto de vista epidemiológico, no Brasil, a LVC é considerada mais importante que a doença humana, pois além de ser mais prevalente, apresenta um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, os quais servem como fonte de infecção para os insetos vetores (Molina *et al.*, 1994; Palatnik-de-Souza *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2009).

A LVC pode evoluir de uma forma assintomática, caracterizada pela ausência de sinais clínicos clássicos associados à doença, para a forma oligossintomática, na qual sinais clínicos moderados podem ser observados. Para a forma sintomática descritos sinais clínicos



clássicos, como alopecia, dermatite furfurácia, úlcera, hiperqueratose, ceratoconjuntivite, onicogribose, paralisia dos membros posteriores, emagrecimento e caquexia. (Deane & Deane, 1955; Mancianti, 1988; Abranches *et al.*, 1991; Reis, 2001; Reis *et al.*, 2006a-b; Giunchetti *et al.*, 2006). Alguns destes sinais clínicos da LVC estão ilustrados na **Figura 2**.



**Figura 2: Manifestações clínicas de cães sintomáticos portadores de leishmaniose visceral.** (a) ceratoconjuntivite com dermatite periocular, (b) lesão facial da pele com dermatite exfoliativa multifocal, (c) epistaxe, (d) onicogribose, (e) lesão de ponta de orelha (Baneth *et al.*, 2008).

A LVC está intimamente relacionada à leishmaniose visceral humana (LVH), sendo necessário o controle da LVC visando à diminuição da LVH. No Brasil, o Programa de Controle da LV (PCLV/MS/Brasil) propõe três medidas para o controle da doença: diagnóstico e tratamento dos casos humanos, aplicação de inseticida para combate ao vetor e a eliminação do reservatório doméstico, quando infectado (Ministério da Saúde, 2006). Vários fatores estão relacionados à falha no controle da doença, dentre eles: (i) dificuldades no combate ao vetor; (ii) grande número de pacientes que não respondem ao tratamento, demonstrando a resistência de cepas aos antimoniais; (iii) a eliminação de cães soropositivos, principalmente se tratando de animais de estimação para os quais a eutanásia do cão nem sempre é permitida; (iv) escassez de métodos de diagnóstico rápidos com elevada sensibilidade e especificidade, tanto para LVH quanto para LVC (Ashford, 1996; Costa & Vieira, 2001; Desjeux, 2004; Gontijo & Melo, 2004).

O tratamento quimioterápico dos cães infectados não é recomendado pela OMS sendo proibido pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2003). Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina anti-LVC assim como melhorias nos testes de diagnóstico da

doença constituem abordagens importantes para o controle da infecção canina e, consequentemente, da humana.

### 2.3 – Testes Diagnósticos para LVC

O diagnóstico da LVC é usualmente realizado para: (i) confirmar a doença, ou seja, associar os sinais clínicos e/ou anormalidades clinicopatológicas com a LVC, (ii) confirmar a presença de infecção para estudos epidemiológicos, (iii) testar cães clinicamente saudáveis vivendo em áreas endêmicas, (iv) prevenir a transmissão por transfusão de sangue e (v) monitorar a resposta ao tratamento da doença (Miró *et al.*, 2008).

Para diagnóstico da LVC pode ser utilizada a detecção de amastigotas em aspirados de lesões cutâneas, linfonodos, medula óssea e baço (Alvar *et al.*, 2004). Entretanto, a busca de amastigotas por citologia pode ser insatisfatória, devido ao baixo à moderado número de parasitos detectados até mesmo em cães sintomáticos (Moreira *et al.*, 2007). Os parasitos podem ser visualizados através de biópsia histopatológica da pele ou de outros órgãos infectados. A identificação definitiva de parasitos dentro de macrófagos nem sempre é possível, no entanto há métodos imunohistoquímicos para detecção ou confirmação da presença de *Leishmania* no tecido (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A cultura de tecidos infectados para o isolamento de parasitos não é capaz de fornecer um diagnóstico rápido e possui menor sensibilidade que a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sorologia (Miró *et al.*, 2008). As abordagens mais utilizadas para a investigação da infecção em cães sintomáticos ou assintomáticos consistem na (i) detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* por técnicas sorológicas e (ii) demonstração do DNA do parasito em tecidos por técnicas moleculares (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A LVC é usualmente diagnosticada pela detecção de anticorpos específicos no soro (IgG) usando técnicas sorológicas como o IFAT (*Indirect Immunofluorescence Antibody Test*) e ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Altos níveis de anticorpos estão associados com alto parasitismo e doença (Reis *et al.*, 2006b). Entretanto, muitos cães podem permanecer soronegativos por vários meses após a infecção (Strauss-Ayali *et al.*, 2004). Mesmo sendo amplamente utilizadas no diagnóstico da LVC, estas técnicas apresentam limitações, pois podem apresentar resultados falso positivos devido à reatividade cruzada com outras doenças, tais como Doença de Chagas, rickettsiose, babesiose e

toxoplasmose (Gomes *et al.*, 2008). A reação cruzada é menos provável de ocorrer quando se empregam peptídeos recombinantes como rA2, rK9, rK26 e rK39 (Boarino *et al.*, 2005).

O IFAT, o qual geralmente utiliza antígenos totais de promastigotas é altamente específico para a detecção de LVC clínica, mas falta sensibilidade (29,4%) para detectar cães assintomáticos (Mettler *et al.*, 2005). A sensibilidade e especificidade da ELISA dependem dos antígenos empregados, os quais podem incluir extrato de promastigota solúvel e proteínas purificadas ou recombinantes (Miró *et al.*, 2008). O extrato bruto é sensível para a detecção da infecção canina clínica ou subclínica, mas fornece baixa especificidade (64%) (Ferreira Ede *et al.*, 2007). Por outro lado, a ELISA com peptídeos recombinantes é bastante específico, mas falta sensibilidade para detecção de cães assintomáticos, dependendo do antígeno empregado (Mettler *et al.*, 2005). Ensaios de ELISA baseados em antígenos recombinantes (sub-epítomos de K9, K26 e K39) têm demonstrado alta especificidade (99%) e sensibilidade (96%) em cães infectados (Boarino *et al.*, 2005).

A análise por *Western blot* de antígenos totais de parasito é considerada sensível até mesmo com baixos títulos de anticorpos no soro (Riera *et al.*, 2004) e tem provado ser altamente específico para diagnóstico da LVC (Carrera *et al.*, 1996). Talmi-Frank *et al.* (2006) utilizando de um teste de *Western blot* quantitativo, durante a infecção canina experimental com *L. infantum*, conseguiram identificar proteínas relacionadas tanto à infecção precoce quanto à persistência do parasito.

O emprego da PCR (reação em cadeia da polimerase) tem aprimorado consideravelmente a sensibilidade do diagnóstico parasitológico da LVC. A detecção do DNA do parasito em tecidos permite um diagnóstico sensível e específico. Várias sequências alvos usando do DNA genômico ou do cinetoplasto (kDNA) tem sido descritas para o diagnóstico molecular da LVC. Os testes baseados no kDNA mostraram ser mais sensíveis para a detecção direta em tecidos infectados (Gomes *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2008). No entanto, é importante ressaltar que a informação fornecida pela PCR não pode ser separada dos dados obtidos das avaliações clinicopatológicas e sorológicas. Os resultados devem ser combinados para uma melhor definição do diagnóstico para leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

## **2.4 – Vacinas contra leishmaniose**

Um dos primeiros avanços no desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose foi a utilização de espécies vivas de *Leishmania* dermatotrópicas, os quais produziam lesões

controladas além de induzir imunidade protetora (Nadim *et al.*, 1983; Mauel, 2002). No entanto, este procedimento foi abandonado devido aos efeitos colaterais na utilização de promastigotas virulentas vivas, como a possibilidade de crescimento incontrolado de lesões cutâneas e aumento de outras doenças da pele, como a psoríase, e também por ocasionar imunossupressão (Handman, 2001). Posteriormente, administrou-se o extrato de promastigotas de *Leishmania* (vacina de 1ª geração) a pacientes com leishmaniose tegumentar americana sendo observada redução das lesões cutâneas durante o tratamento (Salles-Gomes, 1939; Pessoa & Pestana, 1940). Mayrink *et al.* (1990) desenvolveram uma vacina de *Leishmania amazonensis* (Leishvacin®) e, Genaro *et al.* (1996) testaram esta vacina para comprovar seu potencial imunoprotetor comparado a outras vacinas monovalentes (*L. amazonensis*, cepa PH8; *L. guyanensis*, cepa M1176). Os resultados preliminares obtidos (aumento da atividade linfoproliferativa *in vitro* e aumento da produção de IFN- $\gamma$  em células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro*) indicaram que as diferentes preparações vacinais podem induzir proteção contra infecção por *Leishmania* (Genaro *et al.*, 1996).

Vários estudos têm demonstrado que as vacinas de 2ª geração (constituídas por proteínas purificadas ou recombinantes) e de 3ª geração (vacinas de DNA) são promissoras para a produção de imunobiológicos contra leishmaniose (Palatnik-de-Sousa, 2008; Reis *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011b). Dentre os componentes estudados destacam-se: proteína gp63 (Handman *et al.*, 1990; Xu & Liew, 1995), proteína LACK (receptor de proteína quinase c ativada) (Melby *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2007), proteína A2 (Ghosh *et al.*, 2001), antígeno flagelar de *L. chagasi* (LCR1) (Wilson *et al.*, 1995; Streit *et al.*, 2000), antígeno KMP-11 (proteína de membrana cinetoplastídeo 11) (Basu *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2008), proteína Q (Molano *et al.*, 2003); e as proteínas recombinantes LmSTI1 (Campos-Neto *et al.*, 2001), LmSTI1+TSA+LACK (Campos-Neto *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2002) e Leish-111f (Gradoni *et al.*, 2005).

Outra área amplamente explorada no desenvolvimento de vacinas consiste no emprego de métodos relacionados à vacinologia reversa (Serruto & Rappuoli, 2006). Em resumo, após o sequenciamento do genoma e/ou transcrito do patógeno, faz-se a análise dos genes preditos utilizando-se de ferramentas de bioinformática. Análises *in silico* também podem ser realizadas para avaliação da capacidade de determinada proteína produzir uma resposta imune protetora, através da predição de epítomos potenciais para serem apresentados no contexto das moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade principal). Uma vez selecionadas as

proteínas podem ser obtidas por expressão heteróloga e utilizadas para a comprovação de sua real capacidade de induzir proteção em animais (Adu-Bobie *et al.*, 2003; Schatzmayr, 2003; Capecchi *et al.* 2004). A técnica de vacinologia reversa tem sido utilizada em *Leishmania* para a predição de epítomos de célula T (Herrera-Najera *et al.*, 2008; Guerfali *et al.*, 2009) e seleção de genes para constituir vacinas de DNA (Stober *et al.*, 2006).

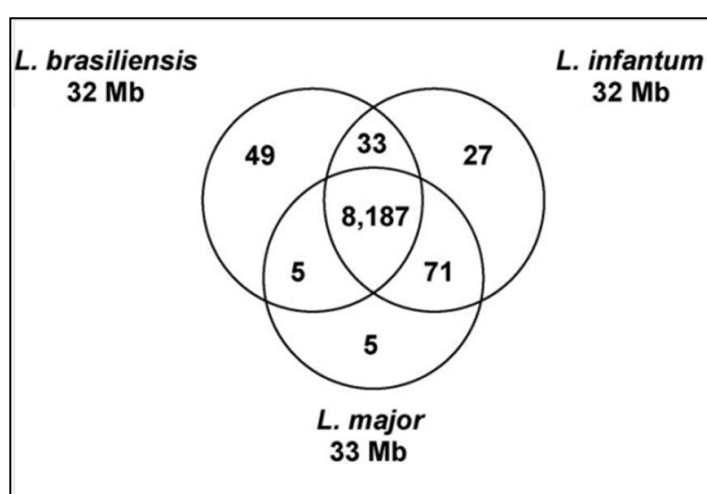
Devido à importância do cão na transmissão da leishmaniose aos seres humanos, vários grupos de pesquisa buscam vacinas contra a LVC. Dentre as vacinas testadas destacam-se duas que apresentaram sucesso em ensaios de fase III. A primeira, uma proteína ligante de manose e fucose (FML), glicoproteína de promastigotas de *L. donovani* associada ao adjuvante saponina, constituiu a vacina Leishmune®, licenciada para uso no Brasil. Após dois anos da vacinação foram observados efeito protetor de 95% e eficácia de 80% (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Palatnik-de-Souza, 2008). A segunda vacina conhecida como LiESAP, registrada como CaniLeish®, baseia-se em antígenos secretados/excretados presentes no sobrenadante da cultura de promastigotas de *L. infantum*, associada ao adjuvante MDP (dipeptídeo muramil). LiESAP demonstrou eficácia de 92% após dois anos de vacinação (Holzmuller *et al.*, 2005, Lemesre *et al.*, 2005, Lemesre *et al.*, 2007). A limitação destas vacinas consiste na discriminação de cães naturalmente infectados dos vacinados. A recomendação dos órgãos oficiais é o sacrifício dos cães soropositivos, o que acarreta relutância do uso destas vacinas por veterinários no Brasil (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006, Palatnik-de-Souza, 2008).

## 2.5 – Proteômica

A última década foi marcada por um grande avanço na área da Parasitologia Molecular, especialmente pela elucidação dos genomas de uma variedade de patógenos (Fleischmann *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 2000; Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001; Ivens *et al.*, 2005). A abordagem genômica envolve o seqüenciamento do conjunto de genes de um organismo, não revelando, porém, dados sobre a expressão destes genes. Informações sobre abundância dos transcritos e presença efetiva das proteínas nas células são obtidas pelo emprego de ferramentas nas áreas da transcrissômica e proteômica (Serruto & Rappuoli, 2006).

O parasito *Leishmania* sp. possui um conteúdo nuclear constituído de 8187 genes compartilhados por pelo menos três espécies, *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*.

Números relativamente baixos de genes são específicos de cada espécie (Dumonteil, 2009). A **Figura 3** representa o diagrama dos genes compartilhados e específicos dessas três espécies de *Leishmania*. Embora seja conhecido que fatores do hospedeiro podem apresentar um papel na evolução da doença, diferenças no conteúdo genético ou na expressão de genes dos parasitos determinam suas respectivas virulências. Desta forma, considerando que em tripanossomatídeos a expressão gênica é regulada principalmente ao nível pós-transcricional, a proteômica constitui ferramenta essencial para o entendimento dos mecanismos de diferenciação de fase, de virulência e de resistência à drogas (Paape & Aebischer, 2011).



**Figura 3:** Diagrama de Venn comparando os genomas de *L. brasiliensis*, *L. infantum* e *L. major*. O número de genes compartilhados e específicos entre as espécies estão indicados (Dumonteil, 2009).

Segundo Wilkins *et al.* (1996), o proteoma constitui o conjunto de todas as proteínas expressas em uma célula ou organismo, em resposta à estímulos internos e externos. Uma descrição compreensiva do proteoma deverá revelar o repertório de todas as proteínas codificadas pelo genoma de um organismo, sob condições fisiológicas e/ou patológicas (López, 2007). Uma análise proteômica detalhada deverá permitir ainda uma descrição quantitativa da expressão protéica e suas alterações frente a mudanças no microambiente celular (Anderson & Anderson, 1998).

A abordagem proteômica clássica baseia-se principalmente, na separação de proteínas pela eletroforese em gel bidimensional (2D), a qual separa as proteínas por dois parâmetros independentes; ponto isoelétrico na primeira dimensão e massa molecular na segunda dimensão. Os diferentes *spots* de proteínas obtidos podem ser retirados do gel, digeridos a peptídeos por proteases específicas e, então, identificados usando espectrometria de massas após análise dos espectros em bancos de dados (Steen & Mann, 2004). Alternativamente, frações protéicas complexas podem ser digeridas em solução e os peptídeos resultantes

separados pelo emprego de métodos cromatográficos diversos. Frações individuais podem ser então simplificadas por separação em fase reversa e os peptídeos identificados por fragmentação em espectrômetro de massas. Esta última abordagem denominada *Shotgun Proteomics* permite o seqüenciamento em larga escala de proteínas e tem contribuído significativamente para elucidação da composição protéica de várias espécies (Gilmore & Washburn, 2010).

A imunoproteômica constitui uma subárea em destaque e de importância para o estudo dos agentes infecciosos. Através da utilização de soros como fonte de anticorpos é possível caracterizar os constituintes imunogênicos de uma preparação protéica, empregando-se basicamente experimentos de *Western blotting* (Tjalsma *et al.*, 2008, Zhang & Lu, 2007; Williams *et al.*, 2009a; Ayalew *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). Em *Leishmania*, esta abordagem foi utilizada para o rastreamento de epítomos de célula B e T CD8+ presentes em proteínas antigênicas de *L. chagasi*, reconhecidas pelos anticorpos de cães portadores de LVC (Costa *et al.*, 2011a).

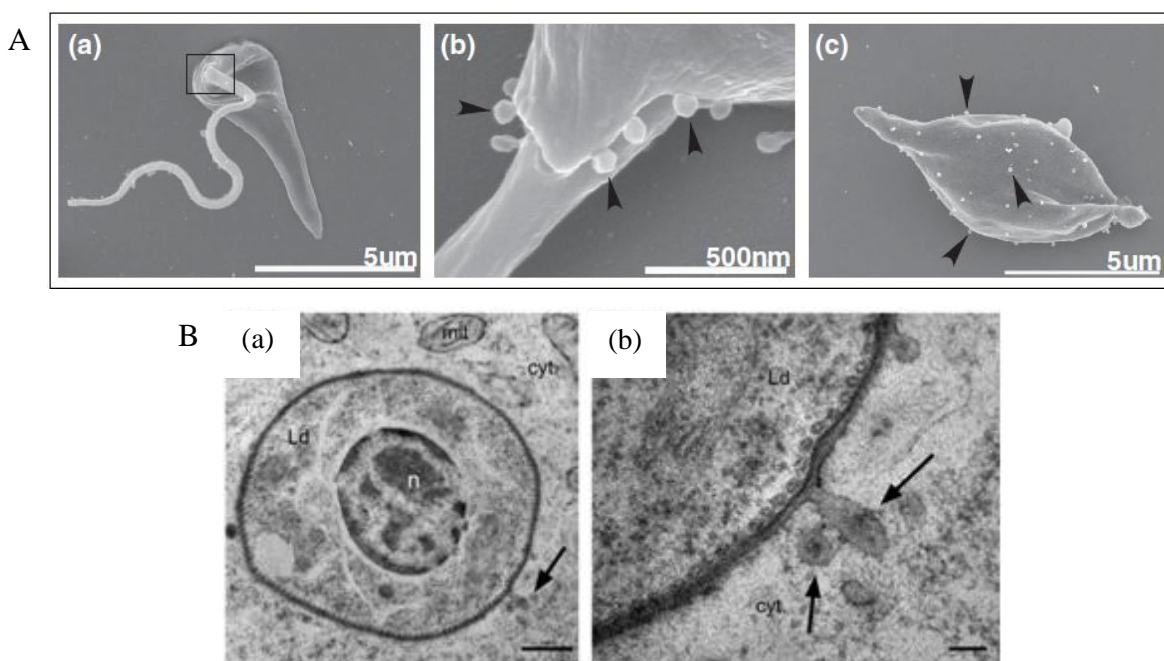
As abordagens proteômicas aplicadas ao estudo da expressão gênica em *Leishmania* abriram a possibilidade de atribuir funções potenciais para as proteínas, incluindo aquelas previamente identificadas pela genômica como hipotéticas. Além disso, novos candidatos vacinais, marcadores para diagnóstico e alvos terapêuticos tem sido apontados (Gopfer *et al.*, 1999; Chenik *et al.*, 2006; Paape *et al.*, 2010).

## **2.5 – Importância das proteínas secretadas no contexto da relação parasito-hospedeiro**

Proteínas extracelulares secretadas por parasitos protozoários e helmintos são mediadores chaves nas interações parasito-hospedeiro. Estas proteínas estão comumente envolvidas em imunoregulação, sinalização e sobrevivência do parasito (Cuervo *et al.*, 2010). Estudos de proteínas secretadas têm contribuído também para a elucidação dos diferentes mecanismos de secreção de proteínas utilizados por estes organismos (Silverman *et al.*, 2008; Nickel, 2010).

Em células de eucariotos, a via de secreção clássica envolve reconhecimento de uma sequência N-terminal em proteínas que serão exportadas, resultando em sua translocação através da membrana do retículo endoplasmático e liberação para o complexo de Golgi (Cuervo *et al.*, 2009). Entretanto, várias proteínas que não apresentam peptídeos sinais têm sido descritas estarem presentes no meio de cultura extracelular, fornecendo evidências para a

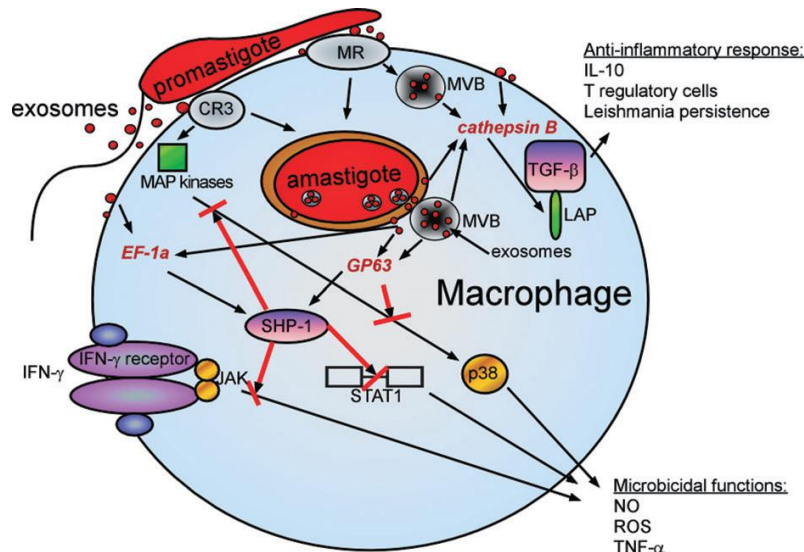
existência de mecanismos não convencionais para secreção de proteínas (Stegmayer *et al.*, 2005; Silverman *et al.*, 2008; Nickel, 2010). Recentemente, foi demonstrado que mais de 98% dos constituintes do secretoma de *L. donovani* não possuem sinais de secreção clássicos amino-terminais. De maneira alternativa, vias de secreção não-clássicas como secreção vesicular mediada por exossomos, vesículas apoptóticas e glicossomos são comumente utilizadas por estes parasitos. (Silverman *et al.*, 2008; Silverman *et al.*, 2010). A **Figura 4A** representa a formação de microvesículas para a secreção em *L. donovani* e a **Figura 4B** demonstra a liberação de exossomos de *L. donovani* nos macrófagos.



**Figura 4:** A) Formação de microvesículas a partir da bolsa flagelar e membrana plasmática de *Leishmania*. (a) Forma promastigota, (b) bolsa flagelar, maior aumento (quadrado) e (c) promastigota em processo de diferenciação em amastigota. Setas apontam as microvesículas (Silverman *et al.*, 2008). B) Exossomos de *Leishmania* são liberados no citoplasma de macrófagos. (a) Seta indica microvesículas semelhantes à exossomos associadas à membrana plasmática da forma amastigota. Barra = 500 nm. (b) Microvesículas mostradas em (a), aumento de 10.000 x. Barra = 100 nm (Silverman *et al.*, 2010).

Parasitos *Leishmania* são capazes de sobreviver nos macrófagos do hospedeiro apesar das condições hostis dos vacúolos fagolisossomais. Tem sido demonstrado que a capacidade de secretar proteínas neste microambiente representa um mecanismo essencial no estabelecimento da infecção e no direcionamento da resposta imune celular (Chenik *et al.*, 2006). Segundo Corrales *et al.* (2010), as proteínas secretadas pelo parasito estão envolvidas na sobrevivência do mesmo, pois modificam o ambiente tornando-o mais favorável ao seu desenvolvimento. A **Figura 5** demonstra o papel das proteínas secretadas via exossomos na sinalização celular em macrófagos.





**Figura 5: Exossomos de *Leishmania* liberam proteínas na célula hospedeira e perturbam a sinalização celular do macrófago.** A *Leishmania* entra no macrófago via fagocitose mediada por receptor, induzindo ativação da via de sinalização da MAP quinases. Os exossomos de *Leishmania* podem entrar nas células alvos de maneira similar ou podem ser liberados a partir de determinada localização intracelular na célula infectada. As proteínas secretadas pela *Leishmania* nos exossomos (mostrados em itálico e fonte vermelha), como EF-1 $\alpha$  e GP63, ativam proteínas do hospedeiro (mostradas em fonte preta), como a tirosina fosfatase (SHP-1), induzindo defosforilação de proteínas centrais de várias vias de sinalização, incluindo MAP quinase/NF-kB e IFN- $\gamma$ /JAK-STAT1. Estes efeitos modificam vias de transdução de sinais acarretando na inibição das funções microbicidas do macrófago. Outros componentes dos exossomos podem propiciar uma resposta anti-inflamatória via clivagem de TGF- $\beta$ . CR3, receptor do complemento; MR, receptor de manose; MVB, corpo multivesicular. (Silverman & Reiner, 2011).

Devido ao limitado número de estudos envolvendo a caracterização proteômica de proteínas secretadas por *Leishmania* (Chenik *et al.*, 2006; Silverman *et al.*, 2008; Cuervo *et al.*, 2009) e considerando que o secretoma de *L. infantum* ainda não foi caracterizado, este trabalho objetivou contribuir para a identificação deste subproteoma e avaliar sua utilização como fonte de novos antígenos a serem utilizados como alvos vacinais e biomarcadores para prognóstico e diagnóstico.

## **3 – Objetivos**

### **3.1 – Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral a caracterização molecular do secretoma de *L. infantum*. Além disso, as proteínas secretadas por *L. infantum* e *L. amazonensis* foram utilizadas em ensaios preliminares para estabelecer uma relação entre imunogenicidade e prognóstico da LVC. O rastreamento de possíveis biomarcadores da infecção visa aplicações em futuros ensaios biotecnológicos, para elaboração de vacinas e/ou aprimoramento das técnicas sorológicas convencionais.

### **3.2 – Objetivos específicos**

3.2.1 – Caracterizar as espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP;

3.2.2 – Analisar a morfologia dos parasitos sob diferentes condições de cultivo;

3.2.3 – Determinar a viabilidade celular dos parasitos durante a obtenção do secretoma de *L. infantum* por citometria de fluxo;

3.2.4 – Analisar o perfil proteico do secretoma de *L. infantum* em gel unidimensional;

3.2.5 – Identificar os constituintes do secretoma de *L. infantum* por espectrometria de massas.

3.2.5.1 – Classificar as proteínas identificadas de acordo com seus processos biológicos;

3.2.5.2 – Analisar as proteínas identificadas de acordo com o parâmetro de quantidade relativa de abundância (*emPAI*);

3.2.5.3 – Empregar ferramentas de bioinformática para validação de proteínas secretadas;

3.2.6 – Apontar marcadores para prognóstico/diagnóstico da infecção por *L. infantum* através de imunoproteômica;

3.2.7 – Avaliar o secretoma de *L. amazonensis* como fonte alternativa de antígenos para o prognóstico e diagnóstico da LVC.

## 4 - Metodologia

### 4.1 – Cepas de *Leishmania*

Como espécies de *Leishmania* consideradas referências pela OMS foram utilizadas três amostras mantidas no criobanco do Laboratório de Imunopatologia (LIMP), do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Ouro Preto. Estas foram utilizadas nos experimentos de caracterização molecular das cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis* empregadas neste estudo, **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Amostras de referência de *Leishmania* sp.

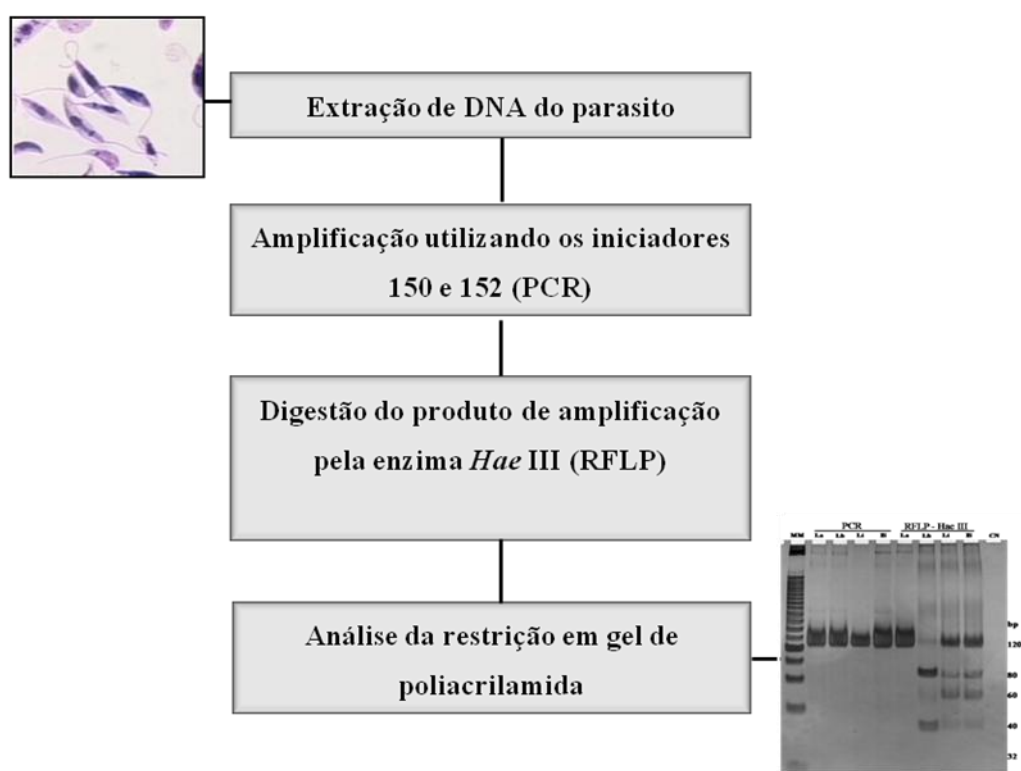
<b>Amostras de referência</b>	<b>Código internacional</b>
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/73/M2269
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/1974/PP75

### 4.2 – Caracterização da espécie de *Leishmania* por PCR-RFLP

A extração do DNA para a técnica de PCR realizou-se a partir de  $1 \times 10^7$  parasitos obtidos na fase *log* de crescimento, utilizando o *kit* de extração Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), seguindo a recomendação do fabricante. Empregou-se para a PCR o par de iniciadores (150) 5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA-3' e (152) 5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C-3', direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* (Degraeve *et al.*, 1994). A reação constituiu de: tampão 1x (Invitrogen®, SP, Brazil), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.0 μM de dNTPs, 1.0 pmol de cada iniciador (150 e 152), 0.76 U Taq DNA polimerase (Fermentas - Sinapse®), 2.5 μL DNA e H<sub>2</sub>O Milli Q totalizando 12.5 μL por poço da placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). As condições utilizadas na reação de PCR incluíram: desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguida por 40 ciclos a 93°C por 30 segundos, 64°C por 1 minuto, 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por sete minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Verit Thermal Cycler 96 well (Applied Biosystems®, Califórnia, USA).

Após a PCR, realizou-se a RFLP do kDNA conforme Volpini *et al.* (2004). Resumidamente, 5μL do produto da PCR foi digerido, com 1U da enzima Hae III, durante 3

horas a 37°C, em tampão de uso 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e H<sub>2</sub>O Milli-Q totalizando 15 µL por poço da placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). Quatro µL do produto contendo os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10% (v:v), após adição de um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0.25% (v:v), xilenocianol 0.25% (v:v) e ficol 15% (v:v)). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA em TBE (Tris-base 89 mM pH 8.0; ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Utilizou-se o marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados com solução de nitrato de prata 0.2% (v:v) (Santos *et al.*, 1993). Como controles positivos da reação utilizaram-se amostras de DNA obtidos de cepas referência da OMS de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). Como controle negativo utilizou-se um tubo contendo todos os componentes da reação, exceto DNA. **Figura 6.**



**Figura 6:** Diagrama referente à técnica de PCR-RFLP empregada na caracterização de parasitos do gênero *Leishmania*.

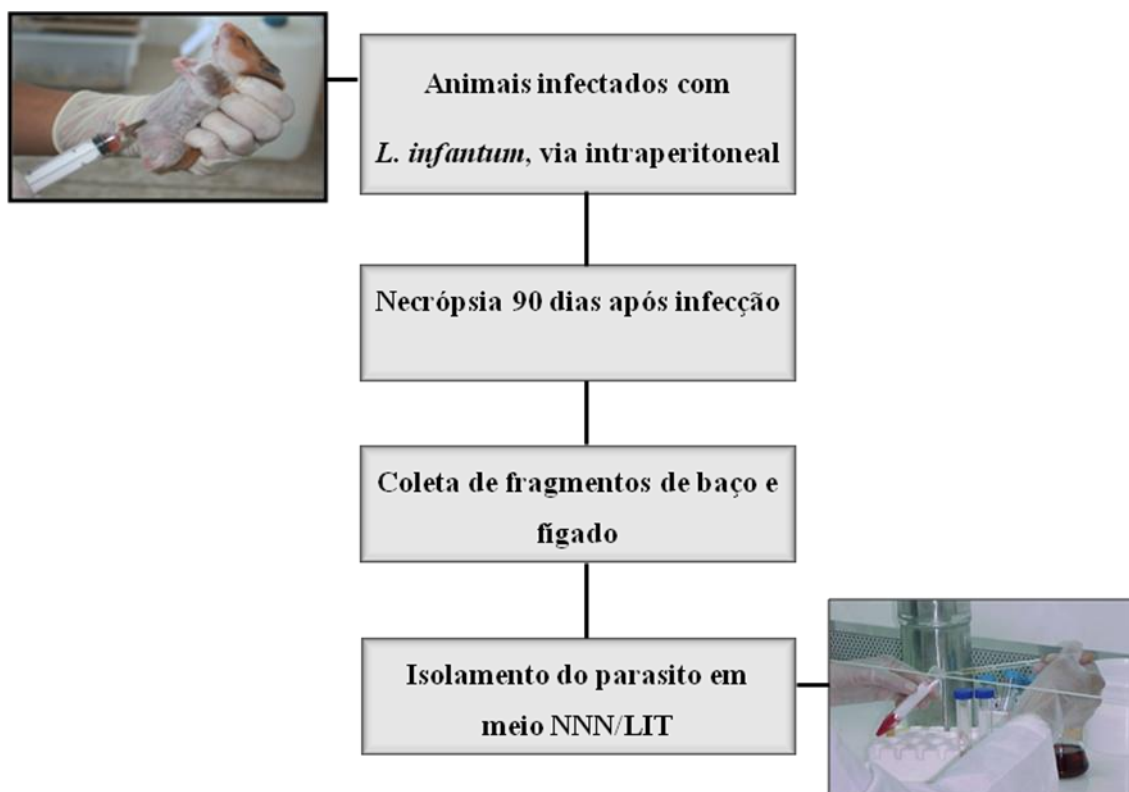
### 4.3 – Obtenção e manutenção da cepa *Leishmania infantum*

Com intuito de se obter a cepa de *L. infantum* realizou-se a necropsia de hamster *Mesocricetus auratus* (5 machos), previamente inoculados via intraperitoneal com  $1 \times 10^7$  promastigotas do parasito. No dia da infecção, os animais possuíam idade de 12 semanas e peso corporal de aproximadamente 100 g. Estes foram mantidos no setor de experimentação em hamster do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), em temperatura entre 21 a 25° C e alojados em gaiolas. Aos animais foram oferecidos diariamente água e ração comercial *ad libitum*. Este trabalho seguiu as normas estipuladas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP, e os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo código Brasileiro de Experimentação Animal.

Após três meses da infecção experimental realizou-se a necropsia dos animais para obtenção de parasitos recém-isolados empregados no presente trabalho. Os procedimentos de eutanásia e necropsia dos hamsters iniciaram após administração de anestésico Tiopental Sódico 2.5% (v:v) (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) na dose de 30 mg/Kg via intraperitoneal. Depois de atingido o plano anestésico adequado administrou-se uma dose letal (120 mg/Kg) do mesmo anestésico. Após a eutanásia os animais foram submergidos em álcool 70% (v:v) por 5 min. Posteriormente, os animais foram secos e realizou-se a tricotomia da região ventral com auxílio de um bisturi. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta com auxílio de uma tesoura cirúrgica. Este procedimento foi realizado no interior de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil). Fragmentos de baço e fígado foram coletados de forma asséptica, utilizando lâminas de bisturi descartáveis, individuais para cada tecido. A partir de cada amostra de tecido coletado, fragmentos de fígado e baço em pedaços de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram colocados em tubo de vidro contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT (Giunchetti *et al.*, 2007). Para cada animal foram mantidos 3 tubos de cada tecido previamente identificado.

Os tubos permaneceram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C e, após sete dias, avaliou-se as culturas através de microscopia óptica a fim de detectar a presença de formas promastigotas do parasito. Após análise das lâminas, retirou-se 1 mL do meio de cada tubo e o transferiu para um novo tubo contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT. A cada sete dias as culturas foram avaliadas ao microscópio. Repetiu-se o procedimento por duas vezes sendo que ao

final de três “repiques”, se não fosse encontrado parasitos, as culturas eram descartadas e o isolamento considerado negativo. Uma vez detectada a presença dos parasitos a cultura foi expandida como descrita a seguir, **Figura 7**.



**Figura 7:** Diagrama referente ao isolamento da cepa de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) empregada no experimento para obtenção de proteínas secretadas.

#### 4.4 - Cultura de *Leishmania* e obtenção das proteínas secretadas e do extrato total

Após o isolamento, cultivou-se promastigotas de *Leishmania infantum* em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) a  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  em BOD (FANEM® modelo 347). Os parasitos recém-isolados (3ª passagem após isolamento) foram expandidos a partir de um inóculo inicial de 20 mL de meio LIT contendo entre  $10^7$  a  $10^8$  promastigotas/mL de *L. infantum* em crescimento logarítmico. Após sete dias do inóculo inicial realizou-se um novo repique, adicionando 60 mL de meio LIT à cultura inicial, distribuídos em *erlemeyers*, sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil). No 14º dia, foi realizado o segundo repique, seguindo a mesma proporção inóculo:meio anterior (1:4), sendo obtidas duas garrafas com 120 mL de cultura cada. Após 21 dias, realizou-se o terceiro repique, nas mesmas condições, sendo obtidas oito garrafas de 120 mL de cultura cada. No

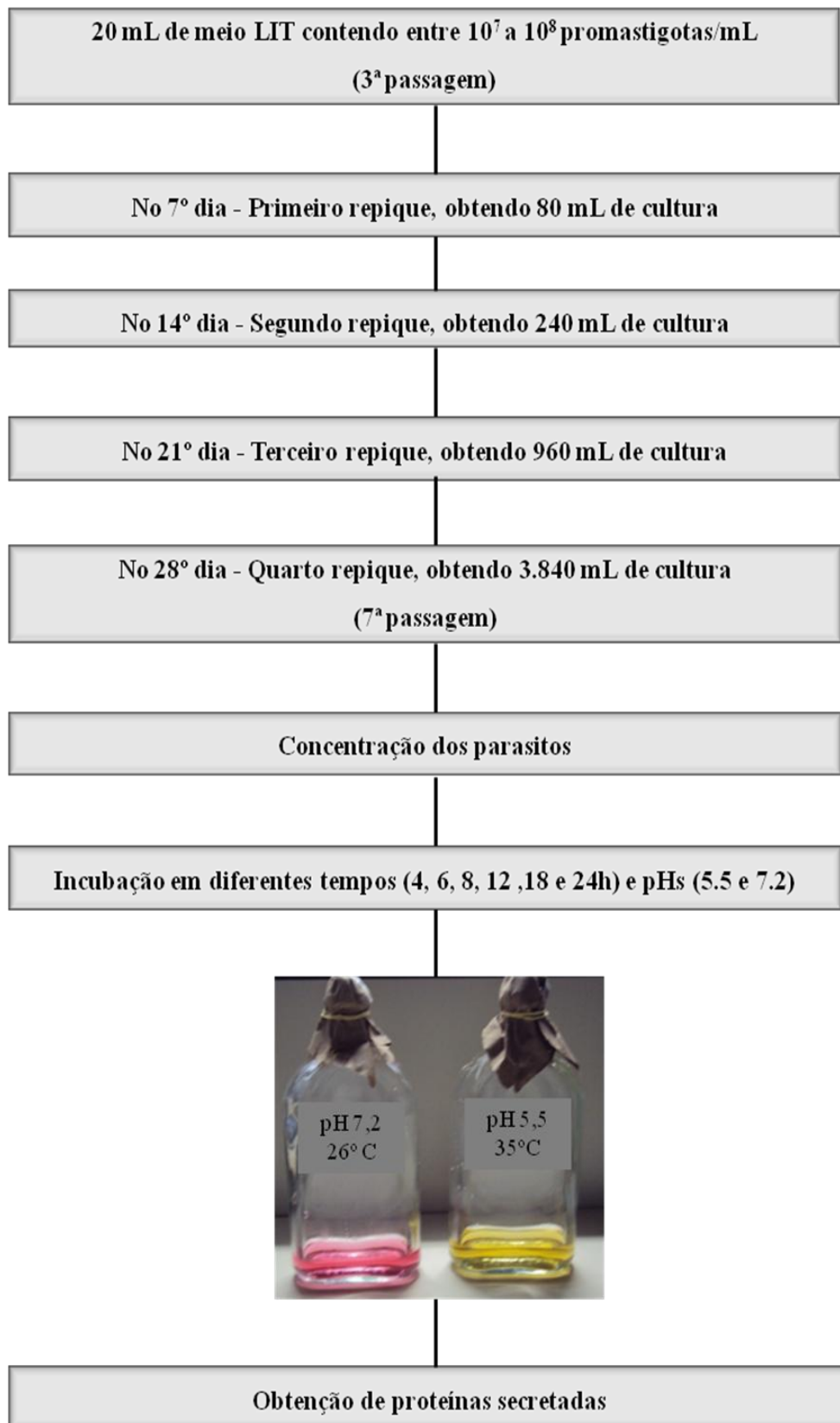
28º dia realizou-se o último repique, obtendo 32 garrafas contendo 120 mL de cultura cada (7ª passagem).

Ao término das quatro semanas de expansão da cultura, os parasitos em fase exponencial de crescimento (sete dias) foram coletados por centrifugação (1276 xg por 10 min a 4°C) e lavados três vezes em meio RPMI 1640 pH 7.2. Os parasitos foram ressuspendidos em 40 mL do meio RPMI pH 7.2 e a quantidade dos mesmos foi estimada através de contagem em câmara de Neubauer e no Auto Hematology Analyzer (BC-2800Vet, MINDRAY).

Posteriormente, realizou-se o inóculo de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL em 24 garrafas de 120 mL contendo meio RPMI, previamente ajustado, com solução de HCl 1 M, para os pHs 5.5 e 7.2. Os parasitos inoculados em RPMI pH 5.5 foram mantidos à 35° C enquanto aqueles inoculados em pH 7.2 foram mantidos à 26° C, conforme descrito por Chenik *et al* (2006). As garrafas foram subdivididas em seis tempos de cultivo (4, 6, 8, 12, 18 e 24h), para cada tempo foram produzidas 4 garrafas de 120 mL, sendo duas de cada pH. Ao término de cada período de cultivo, coletou-se o sobrenadante por centrifugação (1276 xg por 10 min a 4°C) e verificou-se a viabilidade dos parasitos, encontrados no concentrado de parasitos através de microscopia óptica.

As proteínas secretadas recuperadas do sobrenadante dos diferentes períodos de cultivo foram concentradas utilizando tubos Vivaspin 6 mL, *cut off* 3000 Da (GE Healthcare) em centrífuga Eppendorf 5810R (1276 xg a 4°C). Armazenou-se o sobrenadante concentrado (volume final de 1 mL) e o concentrado de parasitos a -80°C para posterior análise (**Figura 8**). A concentração de proteína encontrada no volume final foi estimada por densitometria (software Quantity one)

Para obtenção do extrato de *L. infantum* foi realizada a sonicação da massa de parasitos em tampão de lise (Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 4% (v:v), DTT 65 mM) e centrifugação a 100000 xg por 1h. O sobrenadante obtido foi utilizado para a confecção dos géis.



**Figura 8:** Diagrama ilustrando a expansão da cultura de *L. infantum* e obtenção das proteínas secretadas. Os parasitos foram inoculados em dois pHs distintos (pH 5.5 e pH 7.2) e mantidos sob diferentes temperaturas de cultivo (26° C e 37°C).



#### 4.5 – Análise morfológica dos parasitos durante o período de cultivo

Durante a realização do experimento, preparou-se lâminas dos diferentes tempos de cultivo e pHs para análise de imagem. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 10x e 40x e digitalizadas através da microcâmara Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B, no Laboratório Multiusuário do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

#### 4.6 – Citometria de fluxo

Para avaliar a viabilidade das promastigotas de *Leishmania*, durante os diferentes pHs e períodos de cultivo avaliados, utilizou-se a marcação com iodeto de propídeo e a leitura em citômetro de fluxo. Uma alíquota de 500 µL do concentrado de parasitos foi colocada em tubo de 5 mL (Falcon® 2054, Becton Dickinson, San Diego, EUA), juntamente com 2 ml de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7.2 para lavagem e remoção do meio de cultura. Os tubos foram centrifugados a 450 xg, por 10 min/TA e o sobrenadante desprezado de uma só vez. As células foram ressuspensas em 1 ml de PBS pH 7.2, através de agitação em vórtex (Fisher, Vortex Genie 2, Bohemia, NY, EUA). Novamente o material foi submetido à centrifugação a 450 xg, por 10 min/TA. O sobrenadante desprezado, o sedimento ressuspensado em 1 mL de PBS pH 7.2, agitado em vórtex e as células contadas no aparelho hematológico Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800Vet, Hamburgo, Alemanha). A concentração foi ajustada com acréscimo de PBS pH 7.2, a fim de se obter  $2 \times 10^6$  parasitos/mL. Em seguida, 500 µL de cada um dos diferentes tubos ( $1 \times 10^6$  parasitos) foram retirados para novos tubos de 5 mL e adicionados 1.25µL do iodeto de propídeo (1mg/mL; Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) para a marcação das células não viáveis. As amostras foram submetidas ao citômetro de fluxo BD FACSCalibur® para a leitura com aquisição de 20.000 eventos/tubo e os resultados foram analisados pelo algoritmo Cell Quest Pro® (BD Biosciences). Como controle positivo da metodologia, 500 µL da cultura inicial foram incubados em metanol PA por 10 minutos, para em seguida serem submetidos ao protocolo de marcação com iodeto de propídeo descrito anteriormente. Para estimar a fluorescência basal emitida pelas células, 500 µL de uma cultura controle, contendo promastigotas de *Leishmania* em fase log, foram submetidos ao protocolo experimental descrito anteriormente, excluindo-se a marcação por iodeto de propídeo.

#### 4.7 – Eletroforese e Western Blotting

As proteínas secretadas foram submetidas à eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida a 12% (v:v) (20 mA, por 2-3h). O gel resultante foi corado por *Coomassie Brilliant Blue* ou prata. Posteriormente, o gel réplica foi transferido para uma membrana de PVDF (Polyvinylidene Difluoride, 0.2 µm) a 200 mA, por 2h em solução de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, etanol puro e SDS 10% (v:v)). A membrana foi bloqueada em solução tampão (leite em pó 5% (p:v); Tris-HCl 50 mM pH 7.5; tween 20 a 0.3% (v:v)) por 2h, à temperatura ambiente, e posteriormente lavada 3x por 5min em Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Em seguida, a membrana foi incubada com *pool* de soros de cães naturalmente infectados assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, na diluição 1:2000 em tampão (leite em pó 5% (p:v); Tris-HCl 50 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; tween 20 a 0.3% (v:v)), por 3h, à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a membrana 3x por 5min em Tris-HCl 10 mM pH 7.5 e adicionou anticorpo secundário anti-IgG de cão marcado com fosfatase alcalina (Sigma), na diluição 1:2000 em tampão (leite em pó 5% (p:v); Tris HCl 50 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; tween 20 a 0.3%(v:v)), por 2h, à temperatura ambiente. A detecção das proteínas marcadas foi realizada através de incubação das membranas com solução contendo os substratos para fosfatase alcalina NBT (*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride*) / BCIP (*5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt*) (Sigma), conforme as recomendações do fabricante.

#### 4.8 - Soros de cães

Neste trabalho foram utilizados soros de cães naturalmente infectados por *L. infantum* portadores de diferentes formas clínicas da LVC (assintomáticos, oligosintomáticos e sintomáticos) além de soros de cães sadios (controle), provenientes do Centro de Controle de Zoonose de Belo Horizonte, Minas Gerais. Os soros foram coletados e armazenados conforme descrito por Reis *et al.* (2006b). Para realização da técnica de *Western blotting* utilizou-se *pool* de soros de cinco cães de cada forma clínica.

#### 4.9 – Digestão das proteínas secretadas e espectrometria de massas

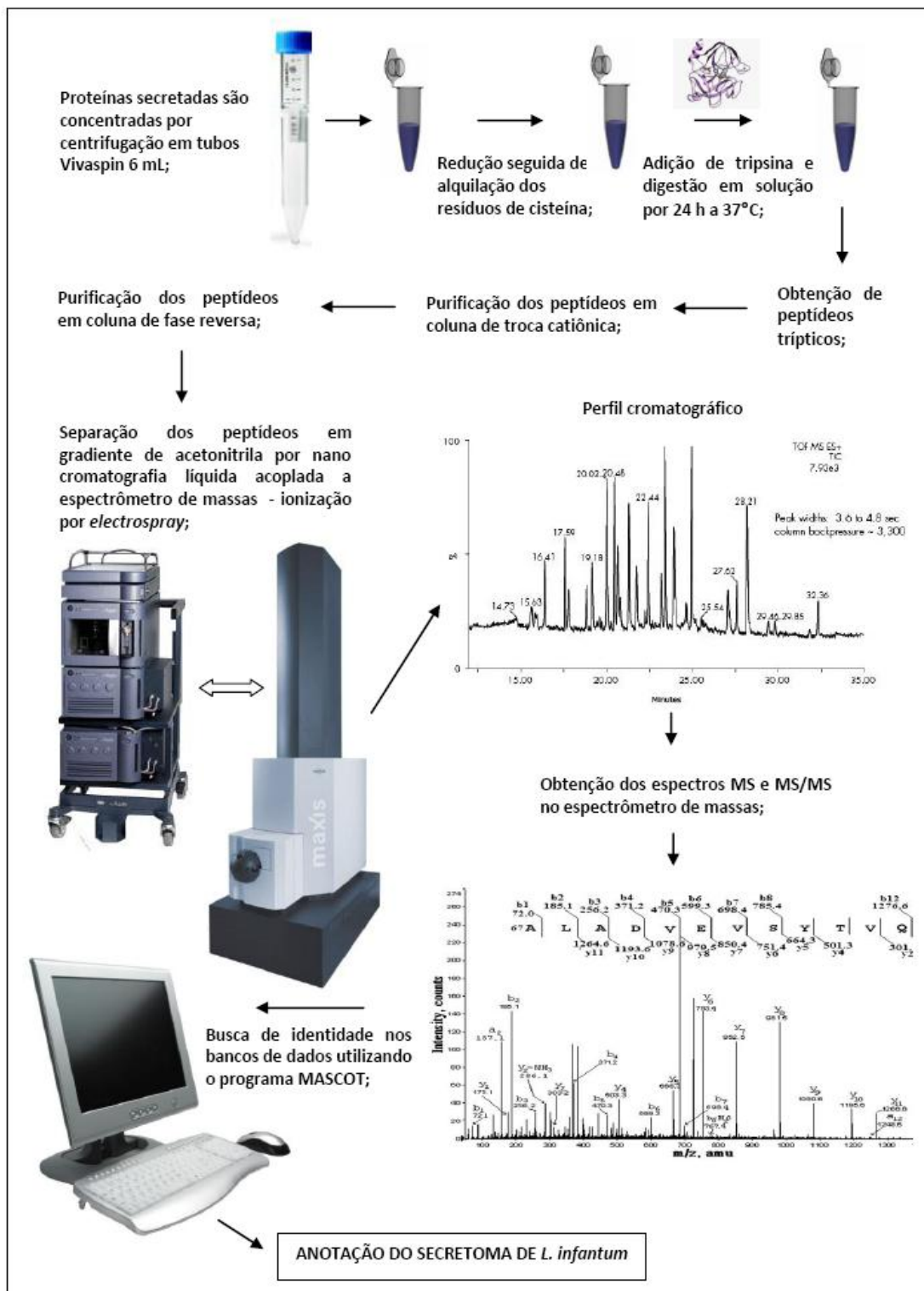
Uma alíquota da fração secretada (sobrenadante de 6h pH 7.2) contendo cerca de 80 µg de proteínas foi submetida ao processo de digestão em solução de acordo com o protocolo descrito a seguir. A fração secretada foi primeiramente solubilizada em SDS 0.1% (v:v) e, em seguida, reduziu-se as proteínas na presença de 6 mM DTT durante 1h a 60°C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, as proteínas foram alquiladas na presença de 12 mM iodoacetamida, durante 15 min ao abrigo da luz. Adicionou-se tripsina (MS Grade, Promega) na proporção de 1:20 (enzima:substrato) a partir de uma solução estoque 0.1 µg/µL de tripsina em 0.1 M bicarbonato de trietilamônio. A digestão por tripsina ocorreu durante 24 h à 37°C. Ácido trifluoroacético (TFA) foi então adicionado para uma concentração final de 0.1% (v:v) e os peptídeos resultantes submetidos à cromatografia de fase reversa em mini-coluna Strata C18-E (55 µm, Phenomenex, Macclesfield, UK). Após lavagem da coluna com 2 mL de TFA 0.1%, os peptídeos foram eluídos em 750 µL de solução 50% (v:v) acetonitrila (ACN)/0.1% (v:v) TFA e, finalmente, concentrados por completo em concentrador à vácuo (speed vaccum).

Para a identificação dos peptídeos por espectrometria de massas, os mesmos foram resolubilizados em 20 µL de solução TFA 0.1% (v:v). Cerca de 3 µL da preparação foram submetidos à pré-coluna nanoAcquity Symmetry C18, 5 µm (180 µm x 20 mm, Waters) acoplada ao sistema nanoAcquity UPLC (Waters) utilizando ácido fórmico a 0.1% (v/v) a um fluxo de 10 µL/min. A pré-coluna foi lavada durante 5 min e, em seguida, o fluxo foi direcionado para a coluna capilar nanoAcquity BEH130 1.7 µm C18 (75 µm x 250 mm, Waters). A separação dos peptídeos nesta coluna realizou-se a partir da utilização de dois solventes, solvente A – 0.1% (v:v) ácido fórmico e solvente B – 100% (v:v) ACN/0.1% (v:v) ácido fórmico. O fluxo para a coluna capilar foi de 300 nL/min, a temperatura da coluna ajustada para 60°C e o perfil do gradiente estabelecido segundo as condições: 5% (v:v) do solvente B por 2 min, seguido por um gradiente linear até 35% (v:v) do solvente B durante 20 min. Finalmente, lavou-se a coluna utilizando 95% (v:v) do solvente B por 2.5 min.

O sistema de nanocromatografia citado acima interfaceado com o espectrômetro de massas maXis (Bruker Daltonics) contendo uma fonte de nano-electrospray, constituíram o equipamento utilizado para a detecção e fragmentação dos peptídeos. Adquiriu-se espectros ESI-MS e MS/MS utilizando o modo AutoMSMS. O controle do instrumento, a aquisição dos dados e o processamento dos resultados foram realizados por meio do algoritmo Compass 1.3

SP1 (microTOF control, Hystar and DataAnalysis, Bruker Daltonics). Os parâmetros de espectrometria de massas para o modo MS incluíram: voltagem do íon “spray” 1500 V, gás de secagem a 6L/min, temperatura do gás de secagem 160°C, faixa de aquisição m/z 50-2.200. No modo AutoMSMS as condições foram as seguintes: dissociação induzida por colisão com gás N<sub>2</sub>, faixa de aquisição m/z 350-1.400, carga dos íons selecionados para fragmentação +2, +3 e +4 e exclusão de íons com carga +1.

Dados obtidos a partir dos espectros MS/MS foram submetidos à busca de identidade utilizando uma cópia local do programa Mascot (Matrix Science Ltd., version 2.1), através da interface Bruker ProteinScape (version 2.1). Utilizou-se o banco de dados NCBI nr (12348165 sequencias; 4221604734 resíduos) e outro contendo sequencias específicas de *Leishmania* sp. (8304 sequencias; 5239081 resíduos) para as buscas de acordo com os seguintes critérios: enzima – Tripsina; modificação fixa – carbamidometilação (C); modificação variável – oxidação (M); tolerância para íon precursor - 10 ppm; tolerância para íons provenientes de fragmentação - 0.1 Da. As buscas levaram em consideração uma taxa de falsos positivos (FDR) de 1% (v:v) e os peptídeos que apresentaram expect value ≤ 0.05 foram considerados identificações significativas, **Figura 9**.



**Figura 9: Delineamento experimental ilustrando as principais etapas para obtenção do secretoma de *L. infantum*.** Após cultivo de *L. infantum* por 6h o sobrenadante de cultura foi coletado e concentrado por centrifugação/filtração. Cerca de 80 µg de proteínas secretadas foram submetidas ao processo de digestão em solução, utilizando tripsina. Os peptídeos tripticos foram purificados através de dois passos cromatográficos para remoção de sais e detergentes. Em seguida, os peptídeos foram fracionados em sistema de nano-HPLC acoplado ao espectrômetro de massas maXis (Bruker Daltonics), o qual opera por ionização do tipo electrospray. Dados de MS/MS foram submetidos à busca de identidade nos bancos NCBI e *Leishmania*. As identidades obtidas foram categorizadas de acordo com os processos biológicos, baseado na classificação GO.

#### 4.10 – Anotação das proteínas identificadas no secretoma de *L. infantum*

As proteínas identificadas foram agrupadas em 10 categorias distintas de acordo com o processo biológico ao qual pertencem: citoesqueleto, resposta ao choque térmico, síntese protéica, metabolismo de carboidratos, metabolismo de nucleotídeos, degradação protéica, metabolismo de aminoácidos, resposta antioxidante, outros processos e hipotética. Para a categorização foram utilizadas as anotações presentes nos bancos de dados *GeneDB* (<http://www.genedb.org>) e *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>). As proteínas categorizadas como hipotéticas foram submetidas a posterior análise por BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

A quantificação relativa das proteínas presentes no secretoma de *L. infantum* foi computada a partir do parâmetro *emPAI* (*exponentially modified protein abundance index* – Ishihama *et al.*, 2005) fornecido pelo programa Mascot. Cinco categorias (resposta ao choque térmico, metabolismo de nucleotídeos, degradação protéica, resposta antioxidante e outros processos) foram selecionadas para análises de bioinformática, com intuito de identificar proteínas genuinamente secretadas, utilizando os algoritmos *SignalP 4.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), *Sigcleave* (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/cgi-in/emboss.pl?action=input&app=sigcleave>) e *SecretomeP 2.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Proteínas de membrana foram identificadas a partir da detecção de  $\alpha$ -hélices transmembranas utilizando o algoritmo *TMHMM Server v. 2.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para predição de localização celular foi utilizado o algoritmo *WoLF PSORT* (<http://wolfsort.org/>).

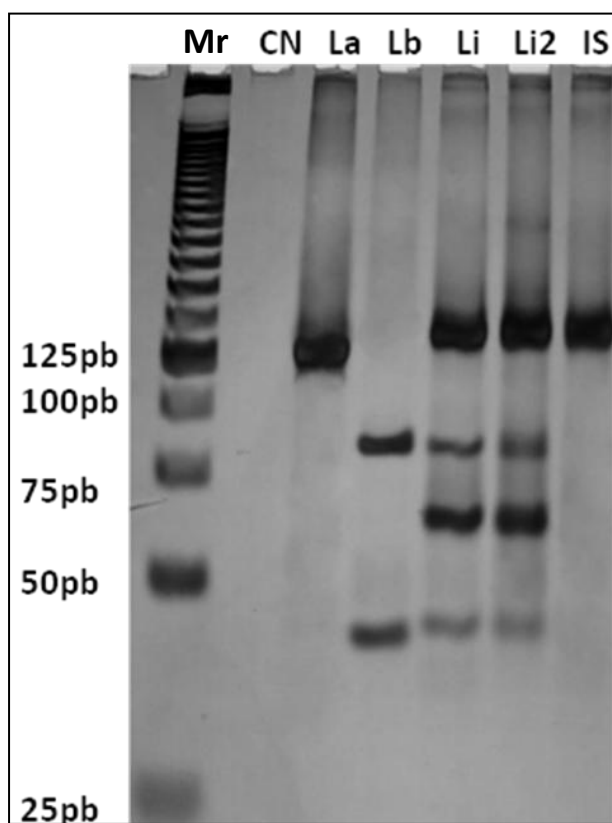
#### 4.11 – Obtenção das proteínas secretadas por *L. amazonensis* e *Western Blotting*

O isolado selvagem de *L. amazonensis* foi cedido pelo Laboratório de Imunopatologia e os experimentos envolvendo este isolado seguiram os protocolos utilizados para *L. infantum*, enumerados nas seções 4.4, 4.7 e 4.8.

## 5 - Resultados

### 5.1 – Triagem molecular utilizando PCR-RFLP para caracterização das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*

O gel representado na Figura 10 mostra os resultados referentes à técnica de PCR-RFLP após amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA contendo 120 pb, seguida pela digestão com enzima de restrição Hae III e separação dos produtos em gel de poliacrilamida 10%. A digestão com Hae III resultou na formação de perfis específicos de restrição, sendo possível discriminar entre as três espécies de *Leishmania*. Para a espécie *L. (V.) braziliensis* foram gerados dois fragmentos (80 e 40 pb), para a espécie *L. (L.) amazonensis* não foram detectados fragmentos, pois não há sítios de restrição na região de 120pb e, para a espécie *L. (L.) infantum* foram observados 4 fragmentos de tamanhos 120, 80, 60 e 40 bp.

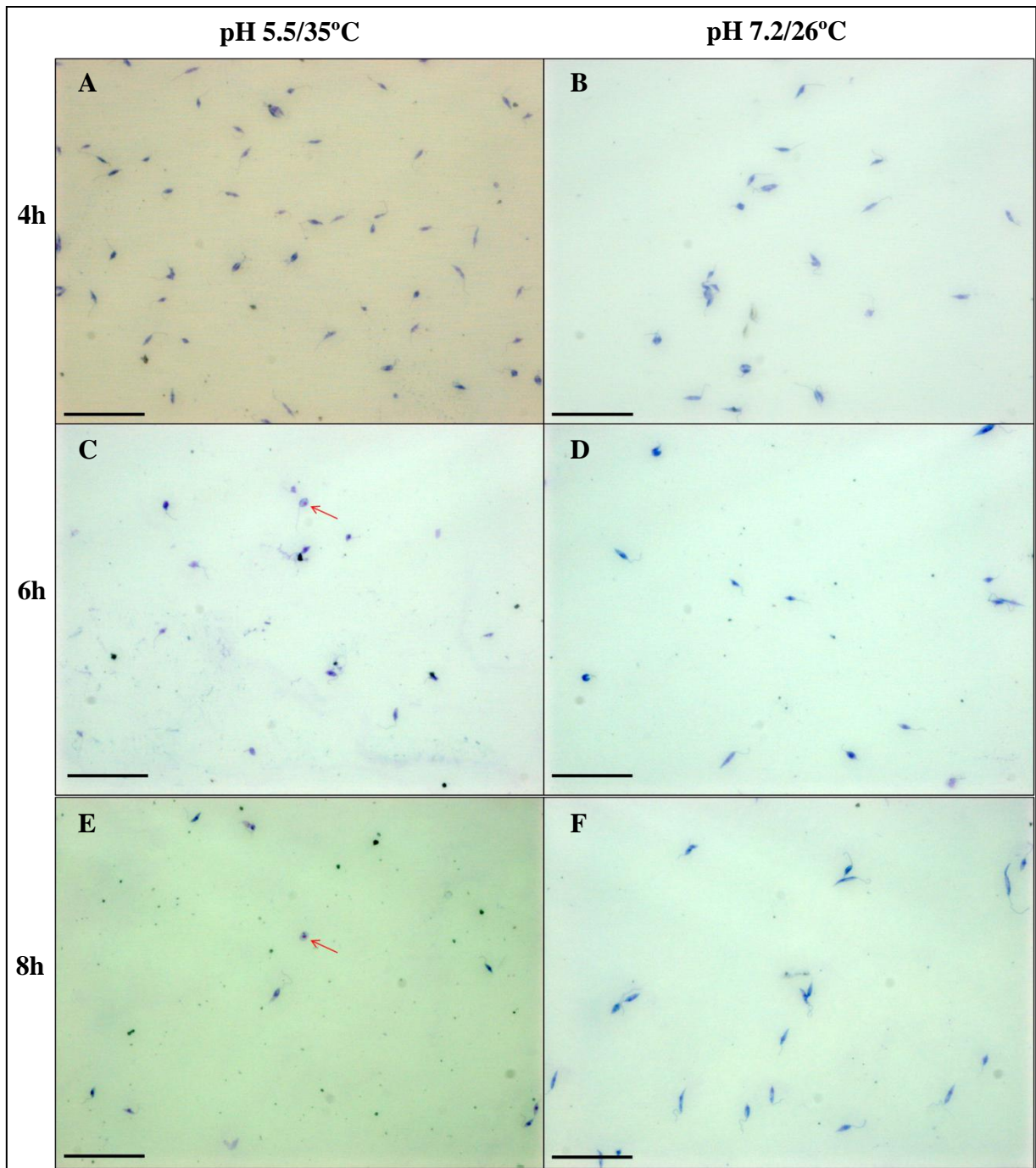


**Figura 10: Produtos de amplificação por PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* após restrição por Hae III.** CN (controle negativo); La, *L. amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269); Lb, *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); Li, *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); Li2, *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) utilizada no experimento; IS isolado selvagem de *L. amazonensis*. Coloração pela prata.

## 5.2 - Análise morfológica em diferentes condições de cultivo para obtenção do secretoma de *L. infantum*

Para avaliação do padrão morfológico celular predominante, associado ao cultivo de *L. infantum* em dois pHs (5.5 e 7.2) e temperaturas distintas (26 e 35°C), alíquotas do concentrado de parasitos foram utilizadas para confecção de lâminas e coloração por hematoxilina e eosina. As imagens das lâminas obtidas após cultivo durante 4, 6 e 8h nos dois pHs estão representadas na **Figura 11**. Após 4h de cultivo, a forma predominante era afilada com aspecto fusiforme, característicos de promastigotas. A partir de 6h, no pH 5.5, foram encontrados parasitos demonstrando forma arredondada (amastigota-símile) – indicados pelas setas. A presença de formas amastigota-símiles foi detectada durante as 24h de cultivo, no entanto, não houve aumento do número total de células apresentando tal morfologia. Por outro lado, durante todos os tempos de cultivo do parasito no pH 7.2 as formas encontradas eram exclusivamente promastigotas.





**Figura 11: Análise morfológica do concentrado de parasitos durante o cultivo para obtenção de proteínas secretadas.** A) Cultivo 4h pH5.5; B) Cultivo 4h pH7.2; C) Cultivo 6h pH5.5; D) Cultivo 6h pH7.2; E) Cultivo 8h pH5.5; F) Cultivo 8h pH7.2. As setas apontam parasitos em processo de diferenciação a amastigotas-símiles. Coloração por Hematoxilina e Eosina. Aumento de 40x. Barra = 50µm.

### 5.3 – Determinação de viabilidade celular durante cultivo de *L. infantum* por citometria de fluxo

Com o intuito de determinar a extensão do dano celular ocorrido durante o cultivo de *L. infantum*, e, desta forma avaliar a homogeneidade do secretoma, alíquotas do concentrado de parasitos, obtidos durante as diferentes condições de cultivo, foram marcadas com iodeto

de propídeo e submetidas à análise de fluorescência por citometria de fluxo. Os resultados mostrados na **Figura 12** foram obtidos levando-se em consideração que o registro de fluorescência é indicativo de alterações morfológicas que comprometem a viabilidade celular. Inicialmente determinou-se a fluorescência basal associada às células de parasitos não marcados, **Figura 12A**. Este procedimento serviu para o ajuste dos parâmetros basais de granulosidade e fluorescência, associados à cultura de *L. infantum*. Em seguida, outra alíquota do concentrado de parasitos foi incubada na presença de metanol, seguido da adição de iodeto de propídeo. Isto resultou na lise celular dos parasitos com conseqüente marcação do material genético. O resultado mostrado na **Figura 12B** demonstrou que nestas condições experimentais o iodeto de propídeo foi capaz de detectar em torno de 95% dos parasitos com alterações celulares. Após estes ajustes iniciais, seguiu-se com a determinação da viabilidade dos parasitos nas diferentes condições de cultivo. A análise do conjunto de parasitos coletados no tempo zero de cultivo demonstrou cerca de 6% de dano celular, **Figura 12C**. Isto pode ser atribuído aos procedimentos necessários (especialmente as lavagens para retirada do meio LIT) no início do cultivo para obtenção do secretoma de *L. infantum*. No entanto, não foram registrados aumentos significativos na percentagem de parasitos não viáveis até 6h de cultivo, nas duas condições experimentais - **Figuras 12D a 12I**. Por outro lado, a coleta dos parasitos no tempo de 12h mostrou a presença de cerca de 30% de células danificadas, impedindo a utilização deste sobrenadante de cultura para caracterização do secretoma de *L. infantum*, **Figuras 12J e 12K**.

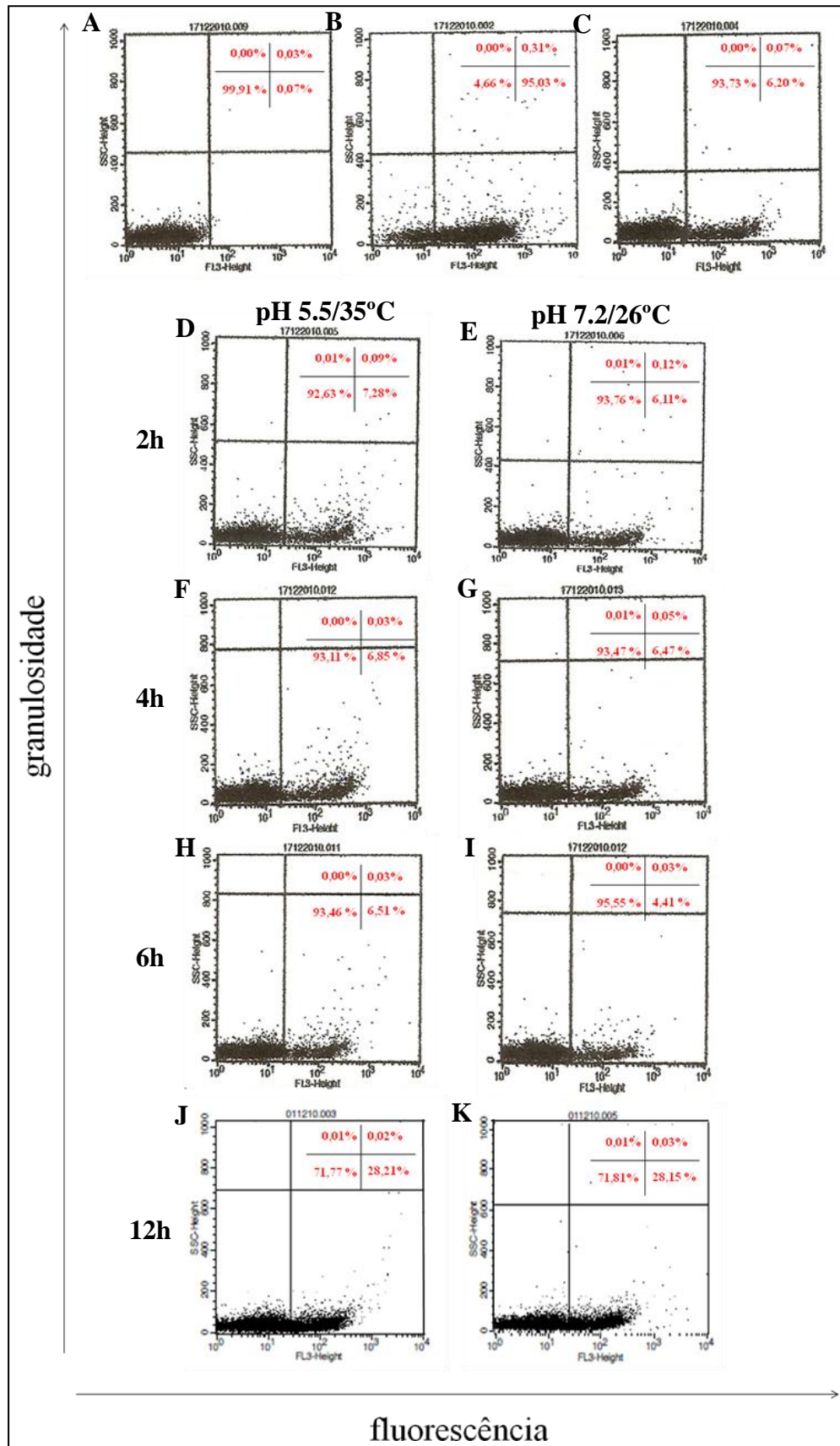
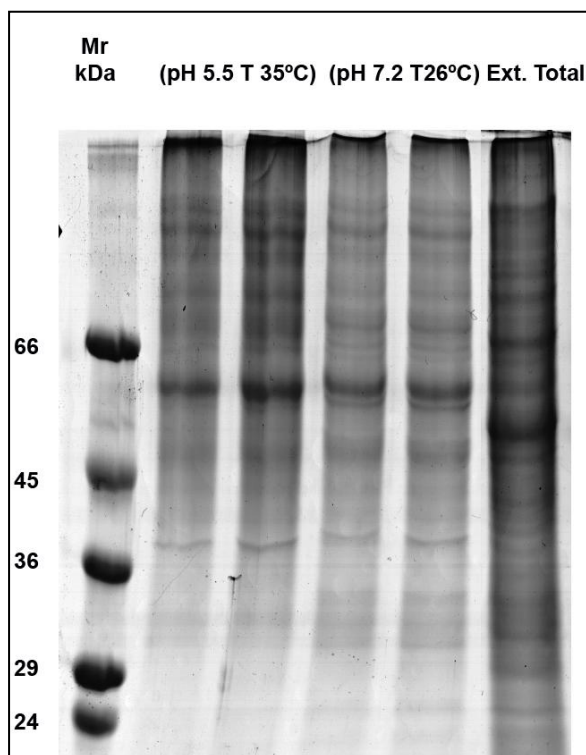


Figura 12: Análise de viabilidade dos parasitos por citometria de fluxo durante o cultivo de *L. infantum*. A) Fluorescência basal de células promastigotas de *L. infantum*; B) Marcação de material genético com iodeto de propídeo após lise da cultura com metanol; C) Viabilidade dos parasitos no tempo 0 de cultivo; D) Cultivo 2h pH5.5; E) Cultivo 2h pH7.2; F) Cultivo 4h pH5.5; G) Cultivo 4h

pH7.2 H) Cultivo 6h pH5.5; I) Cultivo 6h pH7.2 J) Cultivo 12h pH5.5; K) Cultivo 12h pH7.2. No canto superior direito dos gráficos estão indicadas as frequências (% de células - em vermelho), correspondentes a cada quadrante.

#### 5.4 – Análise eletroforética em gel unidimensional para avaliação do perfil proteico associado ao secretoma de *L. infantum*

A análise de viabilidade celular demonstrada pelos experimentos de citometria de fluxo permitiu concluir que o cultivo de *L. infantum* durante 4 a 8h, resultou em frações secretadas contendo menor percentagem de contaminação com componentes intracelulares. Após concentração do sobrenadante de cultura e densitometria em gel unidimensional foi observado que o rendimento do secretoma variou de 110 a 160  $\mu\text{g}$  de proteínas totais. Este rendimento proteico para o secretoma de *L. infantum* foi observado em 2 experimentos independentes. A análise do perfil eletroforético comparando o extrato total de *L. infantum* com as frações secretadas durante cultivo em pH 5.5/35°C e pH 7.2/26°C, mostrou diferenças marcantes entre o proteoma total e o secretoma. O resultado mostrado na **Figura 13** forneceu evidência de que a percentagem de parasitos não viáveis (~6%) não comprometeu o enriquecimento e, conseqüentemente, a homogeneidade do secretoma de *L. infantum*.



**Figura 13: Perfil eletroforético unidimensional dos secretomas e extrato total de *L. infantum*.** Alíquotas contendo cerca de 5  $\mu\text{g}$  das frações de proteínas secretadas (sobrenadantes de cultivo durante 6h) e extrato total foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. Coloração por *Coomassie*.

## 5.5 – Identificação dos constituintes do secretoma de *L. infantum* por espectrometria de massas

Conforme demonstrado na seção 5.4, os perfis eletroforéticos dos secretomas obtidos nas diferentes condições experimentais mostraram-se bastante similares. Desta forma, a fração secretada durante cultivo por 6h em pH 7.2 e temperatura de 26°C foi escolhida para identificação de seus constituintes através de espectrometria de massas. Cerca de 80 µg desta preparação foram inicialmente submetidas ao protocolo de digestão em solução, o qual envolveu desnaturação das proteínas na presença de traços de SDS, seguido de redução e alquilação de cisteínas, de modo a facilitar a digestão proteolítica pela enzima tripsina. Após etapas de purificação dos peptídeos gerados, os mesmos foram submetidos à separação cromatográfica, utilizando fase reversa, através do emprego de gradiente de acetonitrila. Este passo cromatográfico foi diretamente acoplado à entrada de um espectrômetro de massas que opera por ionização do tipo *electrospray*, resultando na detecção dos peptídeos trípticos; seguido de fragmentação dos íons de múltiplas cargas de maior abundância.

A análise dos dados de fragmentação dos espectros MS/MS foi realizada utilizando o Mascot, a partir da seleção dos bancos de dados NCBIInr e outro contendo sequências específicas de *Leishmania* sp. Ao todo, 160 proteínas foram identificadas e posteriormente categorizadas em 9 classes funcionais e uma hipotética; utilizando anotações já existentes nos bancos de dados ou através de novas análises por BLASTp e GeneOntology, **Tabela 2**. Conforme observado, a estratégia utilizada para identificação dos constituintes do secretoma de *L. infantum* mostrou-se satisfatória a julgar pela qualidade dos dados espectrais. Várias proteínas identificadas apresentaram percentagem de cobertura >30%, no entanto, para a grande maioria, a menor cobertura não foi associada à baixa qualidade de espectros. Isto pode ser explicado pela grande variação de massa molecular e abundância observadas para os constituintes do secretoma de *L. infantum*. Os dados espectrais relacionados à fragmentação de cada peptídeo estão descritos na **Tabela Suplementar 1**, em anexo.

**Tabela 2:** Proteínas identificadas por espectrometria de massas e categorizadas de acordo com o processo biológico ao qual pertencem.

Identidade & Categoria funcional	pI	kDa	% Cobertura	Nº de acesso	empAI
<i>Citoesqueleto</i>					
beta tubulina	4.74	50.334	54	LinJ08_V3.1290	8.29
beta tubulina	4.71	50.395	54	LinJ08_V3.1280	8.24
alfa tubulina	4.89	50.526	49	LinJ13_V3.0330	5.05

proteína paraflagelar rod 1D	5.30	69.475	14	LinJ29_V3.1880	0.48
proteína paraflagelar rod 2C	5.40	69.373	4	LinJ16_V3.1510	0.14
actina	5.41	42.307	7	LinJ04_V3.1250	0.07
<b>Resposta ao choque térmico</b>					
proteína de choque térmico hsp70	5.35	71.509	42	LinJ28_V3.2960	2.16
proteína de choque térmico hsp83-1	5.08	81.013	18	LinJ33_V3.0360	0.69
proteína 1 relacionada ao choque térmico 70	6.00	69.317	10	LinJ30_V3.2470	0.36
proteína de choque térmico	10.01	95.724	13	LinJ18_V3.1350	0.33
proteína de choque térmico DnaJ	7.49	44.304	4	LinJ27_V3.2350	0.07
proteína sti1 induzida por estresse	5.90	62.770	2	LinJ08_V3.1020	0.05
proteína relacionada a hsp70	5.10	70.877	1	LinJ26_V3.1220	0.04
proteína do choque térmico	6.96	72.367	2	LinJ33_V3.2520	0.04
<b>Síntese protéica</b>					
fator de iniciação eucariótico 4a	5.83	45.356	30	LinJ01_V3.0790	1.08
fator de elongação 2	5.77	94.942	30	LinJ36_V3.0190	1.03
fator de elongação 1 beta	5.14	25.920	16	LinJ34_V3.0870	0.58
fator de elongação 1-alfa	9.03	49.497	11	LinJ17_V3.0090	0.44
endoribonuclease L-PSP (pb5)	5.87	17.307	16	LinJ23_V3.0220	0.41
proteína S18 do ribossomo 40S	10.48	19.094	5	LinJ36_V3.0990	0.17
proteína S9 do ribossomo 40S	10.65	22.295	5	LinJ07_V3.0760	0.14
arginil-RNAt sintetase	5.73	78.821	3	LinJ27_V3.1230	0.12
fator de elongação 1 gama	5.89	51.885	3	LinJ09_V3.1020	0.12
proteína S4 do ribossomo 40S	10.30	30.802	3	LinJ13_V3.1120	0.10
proteína L7a do ribossomo 60S	10.74	39.476	4	LinJ07_V3.0550	0.08
<b>Metabolismo de carboidratos</b>					
enolase	5.33	46.634	56	LinJ14_V3.1240	4.40
fosfoenolpiruvato carboxiquinase	8.40	58.749	20	LinJ27_V3.1710	0.77
2,3-bisfosfoglicerato independente de fosfoglicerato	5.26	61.007	24	LinJ36_V3.6960	0.64
transaldolase	5.55	37.234	18	LinJ16_V3.0760	0.63
subunidade beta da ATPase	5.14	56.485	19	LinJ25_V3.1210	0.62
frutose-1,6-bifosfato aldolase	8.83	41.093	20	LinJ36_V3.1320	0.55
fosfomanomutase	5.37	28.352	14	LinJ36_V3.2070	0.53
álcool desidrogenase dependente de NADP	5.96	39.117	12	LinJ23_V3.0410	0.36
piruvato kinase	6.13	50.270	10	LinJ35_V3.0030	0.35
subunidade alfa da ATPase	9.73	62.794	10	LinJ05_V3.0500	0.34
proteína hipotética	5.80	30.723	8	LinJ25_V3.2090	0.34
aldose epimerase 1	5.83	42.117	8	LinJ35_V3.0990	0.24
malato desidrogenase citosólica	6.45	34.405	6	LinJ28_V3.3090	0.19
6-fosfogluconato desidrogenase	5.82	52.424	7	LinJ35_V3.3390	0.19
hexoquinase	8.82	52.243	6	LinJ21_V3.0300	0.19
glicose-6-fosfato isomerase	6.14	67.253	6	LinJ12_V3.0490	0.15
aconitase	6.47	98.133	4	LinJ18_V3.0510	0.13
triosefosfato isomerase	8.59	27.404	5	LinJ24_V3.0870	0.12
glicose-6-fosfato desidrogenase	5.81	63.886	7	LinJ34_V3.0080	0.10
fumarato hidratase	6.43	63.324	6	LinJ29_V3.2080	0.10
piruvato fosfato diquinase	8.74	101.228	4	LinJ11_V3.1000	0.09
malato desidrogenase	9.23	33.781	3	LinJ19_V3.0710	0.09
acetil-CoA sintetase	5.90	78.888	3	LinJ23_V3.0580	0.08
gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	9.06	39.292	3	LinJ30_V3.2990	0.08
2-oxiglutarato desidrogenase	9.01	42.006	2	LinJ28_V3.2600	0.07
fosfomanose isomerase	5.75	47.130	3	LinJ32_V3.1660	0.07

<b>Metabolismo de nucleotídeos</b>					
nucleosídeo difosfato kinase b	7.78	16.728	84	LinJ32_V3.3100	15.55
histidina fosfatase ácida secretada	5.25	71.328	25	LinJ36_V3.6770	1.67
metiltioadenosina fosforilase	6.34	33.640	15	LinJ05_V3.0830	0.56
adenosina deaminase	5.15	41.332	10	LinJ35_V3.2200	0.34
proteína semelhante a nucleosídeo hidrolase	4.76	39.627	7	LinJ14_V3.0130	0.08
proteína hipotética	7.40	232.711	0	LinJ03_V3.0510	0.01
<b>Degradação protéica</b>					
carboxipeptidase	5.44	57.449	29	LinJ33_V3.2670	1.09
thimet oligopeptidase	5.84	77.806	23	LinJ26_V3.1550	0.87
carboxipeptidase	5.48	57.557	16	LinJ13_V3.0090	0.45
dipeptidil-peptidase III	5.29	76.287	13	LinJ05_V3.0960	0.43
cisteína peptidase C	5.25	37.850	12	LinJ29_V3.0860	0.38
proteína ativadora de proteassoma pa26	5.35	24.001	8	LinJ35_V3.0770	0.28
subunidade beta 7 do proteassoma 20S	5.15	25.191	14	LinJ34_V3.4390	0.27
subunidade alfa 2 do proteassoma	5.43	25.286	7	LinJ21_V3.2070	0.27
cisteína peptidase semelhante a calpaína	4.70	13.037	8	LinJ14_V3.0910	0.25
carboxipeptidase	5.82	57.578	7	LinJ14_V3.0180	0.23
subunidade beta 3 do proteassoma	5.33	22.790	7	LinJ28_V3.0110	0.14
peptidil-dipeptidase	5.85	76.871	5	LinJ02_V3.0710	0.13
aminopeptidase P	5.62	54.431	3	LinJ35_V3.2400	0.12
aminopeptidase	6.47	58.012	4	LinJ11_V3.0640	0.11
subunidade alfa 1 do proteassoma	7.60	27.488	4	LinJ35_V3.4910	0.11
subunidade beta 1 do proteassoma GP63	6.81	30.682	4	LinJ12_v4.0030	0.10
	6.82	64.912	4	LinJ10_V3.0490	0.10
proteína CAP5.5 associada ao citoesqueleto	5.49	80.943	2	LinJ31_V3.0450	0.08
cisteína protease A	6.69	39.418	3	LinJ19_V3.1460	0.08
proteína succinil-diaminopimelato semelhante a desuccinilase	5.60	51.235	3	LinJ31_V3.2060	0.06
cisteína peptidase semelhante a calpaína	4.29	113.808	2	LinJ20_V3.1210	0.06
aminopeptidase	5.73	97.262	3	LinJ29_V3.2350	0.06
aminopeptidase	6.88	56.613	3	LinJ33_V3.2700	0.06
peptidase	5.03	125.218	1	LinJ31_V3.3210	0.05
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>					
proteína hipotética	5.30	32.927	18	LinJ34_V3.4230	0.58
cistationa gama liase	6.31	45.068	13	LinJ35_V3.3280	0.50
glutamato desidrogenase	7.55	49.556	7	LinJ28_V3.3140	0.28
S-adenosilhomocisteína hidrolase	5.75	48364	7	LinJ36_V3.4100	0.28
delta-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	8.51	62.656	5	LinJ03_V3.0190	0.16
proteína hipotética	5.17	41.313	8	LinJ36_V3.6170	0.16
aspartato aminotransferase	6.77	46.376	4	LinJ35_V3.0840	0.14
proteína hipotética	8.57	23.629	6	LinJ34_V3.3140	0.13
arginase	7.10	36.641	6	LinJ35_V3.1490	0.09
cisteína sintase	8.70	34.813	4	LinJ36_V3.3750	0.09
proteína hipotética	5.72	39.914	5	LinJ01_V3.0500	0.08
proteína hipotética	5.67	39.329	2	LinJ20_V3.0980	0.08
S-adenosilmetionina sintetase	5.50	43.498	3	LinJ30_V3.3560	0.07

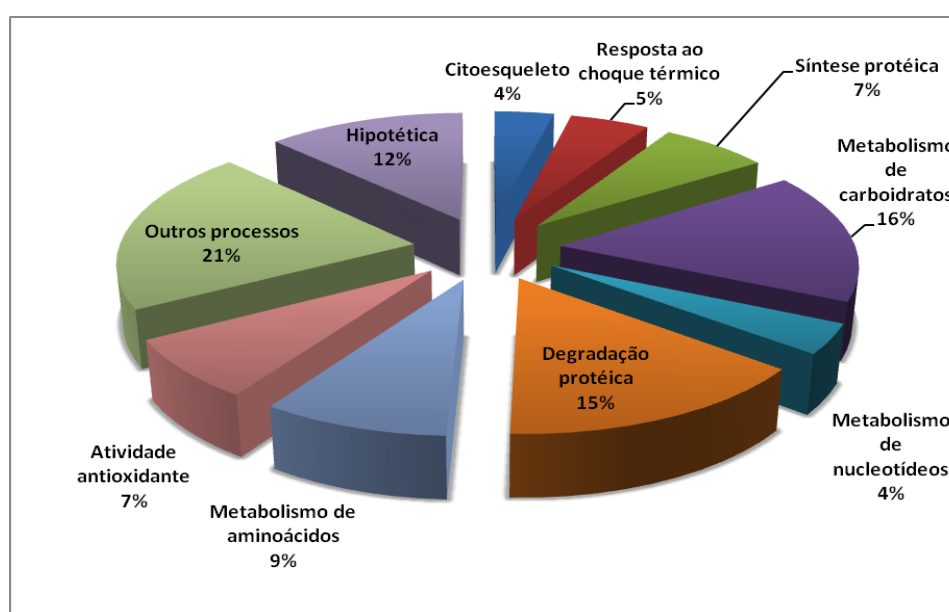


alanina aminotransferase	6.01	55.698	2	LinJ12_V3.0580	0.06
<b>Atividade antioxidante</b>					
triparedoxina peroxidase	7.55	22.465	63	LinJ15_V3.1140	5.40
triparedoxina peroxidase	6.74	22.508	63	LinJ15_V3.1100	5.34
triparedoxina	5.24	16.800	45	LinJ29_V3.1250	3.07
peroxidoxina	6.43	25.582	23	LinJ23_V3.0050	1.27
ferro superóxido dismutase	6.49	21.742	31	LinJ32_V3.1910	0.73
tripanotiona redutase	5.85	53.620	25	LinJ05_V3.0350	0.66
ferro superóxido dismutase	8.46	26.536	12	LinJ08_V3.0300	0.40
proteína dissulfido isomerase	8.76	15.071	5	LinJ06_V3.1090	0.21
redutase 1 dependente de thiol	6.44	50.294	7	LinJ33_V3.0260	0.20
triparedoxina	6.60	17.287	7	LinJ29_V3.1240	0.19
tripanotiona sintetase	5.57	74.753	3	LinJ27_V3.1770	0.08
proteína dissulfido isomerase	5.42	52.767	2	LinJ36_V3.7280	0.06
<b>Outros processos</b>					
prostaglandina 2 alfa sintase	6.19	31.905	47	LinJ31_V3.2210	3.11
histona h4	10.49	11.588	41	LinJ06_V3.0010	1.72
histona H2B	11.41	12.322	37	LinJ09_V3.1410	1.56
ciclofilina a	7.64	19.044	29	LinJ25_V3.0940	1.17
proteína de membrana do cinetoplastídeo 11	5.96	11.285	20	LinJ35_V3.2250	1.14
histona h4	10.56	11.586	30	LinJ15_V3.0010	1.12
calmodulina	4.10	16.814	32	LinJ09_V3.0970	1.02
proteína de fusão de ubiquitina	9.91	14.958	24	LinJ31_V3.1930	0.80
proteína rab1 ligante de GTP	5.55	22.468	18	LinJ27_V3.0620	0.70
fator de liberação de histamina dependente de IgE	4.39	19.606	14	LinJ24_V3.1560	0.57
fator de transporte nuclear 2	4.92	13.935	19	LinJ10_V3.0900	0.52
proteína semelhante a cofilina	6.62	15.905	11	LinJ29_V3.0520	0.45
ciclofilina	6.51	20.466	16	LinJ06_V3.0120	0.34
fator de ribosilação de adp	8.49	20.276	17	LinJ31_V3.2890	0.34
calreticulina	4.58	45.147	12	LinJ31_V3.2670	0.31
receptor de proteína quinase c ativada	6.05	34.864	12	LinJ28_V3.2940	0.30
biotina	6.07	28.946	9	LinJ31_V3.1070	0.23
histona h2a	10.80	14.041	6	LinJ21_V3.1160	0.23
histona h3	11.17	14.795	10	LinJ10_V3.0920	0.22
proteína 1 carreadora de ATP, ADP	9.73	35.530	5	LinJ19_V3.0190	0.18
riboflavina quinase	4.90	20.632	7	LinJ35_V3.3210	0.15
mio-inositol-1-fosfato sintase	5.12	46.892	5	LinJ14_V3.1450	0.14
aldeído desidrogenase	7.97	54.728	4	LinJ25_V3.1160	0.12
subunidade regulatória da proteína quinase A	4.80	56.837	3	LinJ13_V3.0160	0.11
nitrilase	5.99	31.447	3	LinJ26_V3.2290	0.10
isômero-d específico proteína hidroxíácido 2	5.40	37.581	4	LinJ34_V3.4360	0.08
proteína quinase ativada por mitógeno	5.41	46.893	3	LinJ33_V3.1470	0.07
proteína 1 do complexo t, subunidade gama	5.98	60.838	1	LinJ23_V3.1460	0.05
RNA helicase dependente de ATP	9.03	67.223	1	LinJ32_V3.0410	0.05
pirofosfatase 1 de translocação de próton tipo vacuolar	5.12	83.799	1	LinJ31_V3.1240	0.04
proteína 78 regulada por glicose	5.08	71.989	3	LinJ28_V3.1310	0.04
proteína hipotética	9.24	93.040	0	LinJ26_V3.0910	0.03
<b>Hipotéticas</b>					



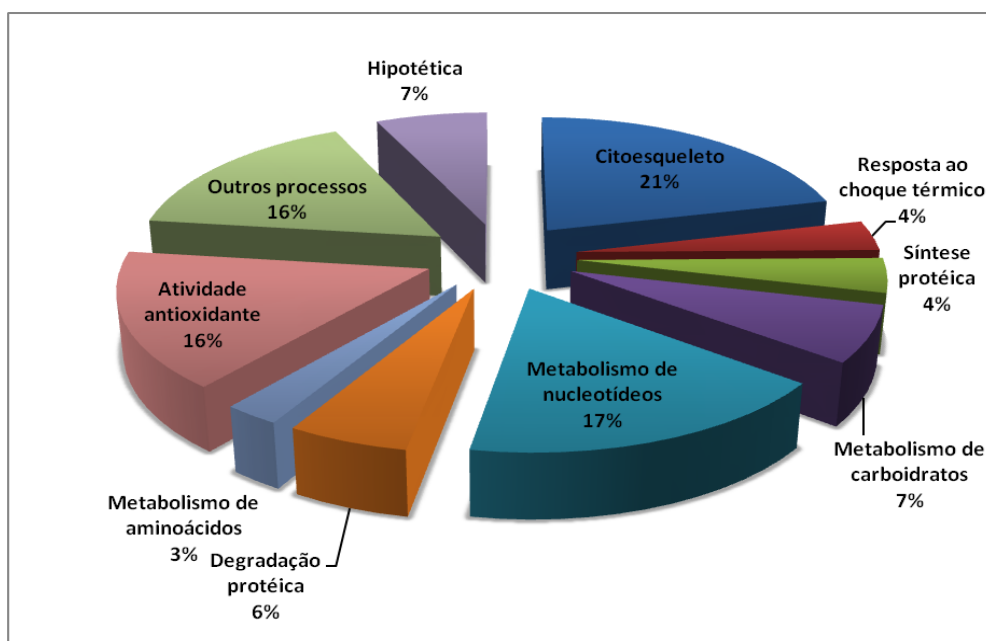
proteína hipotética	4.95	16.955	21	LinJ23_V3.1980	1.38
proteína hipotética	5.21	41.184	26	LinJ26_V3.2710	0.93
proteína hipotética	5.01	32.058	32	LinJ08_V3.1220	0.93
proteína hipotética	5.87	13.269	33	LinJ30_V3.2870	0.92
proteína hipotética	5.53	13.389	16	LinJ18_V3.1640	0.54
proteína hipotética	4.64	14.453	22	LinJ33_V3.0660	0.50
proteína hipotética	5.33	17.793	12	LinJ02_V3.0520	0.39
ribonuclease associada a mitocôndria	7.04	25.166	14	LinJ08_V3.0330	0.27
proteína hipotética	9.30	16.663	8	LinJ34_V3.1620	0.19
proteína hipotética	5.61	21.190	4	LinJ32_V3.0660	0.15
proteína hipotética	4.63	22.563	7	LinJ14_V3.0190	0.14
proteína hipotética	9.59	22.036	5	LinJ34_V3.2410	0.14
proteína hipotética	4.73	22.432	6	LinJ27_V3.1920	0.14
proteína Gim5A	8.91	25.239	8	LinJ35_V3.3750	0.13
proteína hipotética	6.48	56.309	5	LinJ32_V3.0890	0.11
proteína hipotética	8.58	46.964	2	LinJ11_V3.0880	0.07
proteína hipotética	4.99	89.762	2	LinJ26_V3.1960	0.07
proteína hipotética	8.31	57.228	1	LinJ13_V3.0250	0.05
proteína semelhante a proteína de interação com EIF3	8.66	63.054	1	LinJ36_V3.0270	0.05
proteína hipotética	6.80	103.856	0	LinJ36_V3.5330	0.03

Tomando por base apenas o número total de constituintes em cada categoria destacam-se principalmente três processos biológicos (1) outros processos - 21%, (2) metabolismo de carboidratos - 16%, e (3) degradação protéica - 15% **Figura 14**. As proteínas relacionadas a outros processos biológicos englobam proteínas envolvidas na organização do nucleossoma, homeostase do cálcio, tráfico intracelular, metabolismo de lipídeos, enovelamento protéico e transdução de sinais.



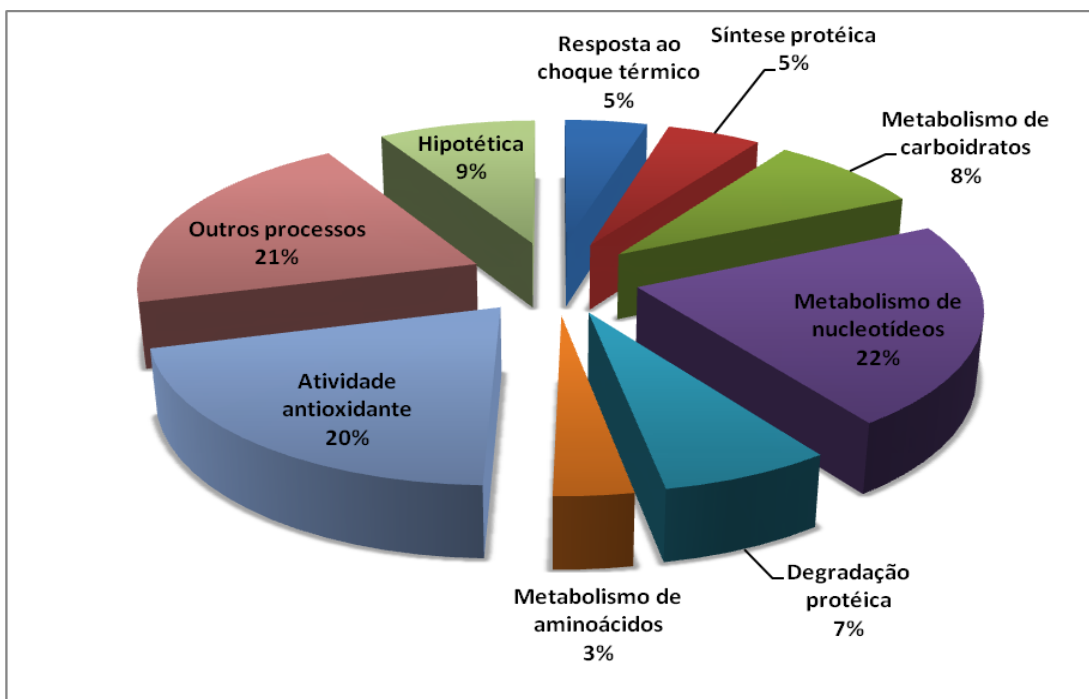
**Figura 14:** Categorização biológica das proteínas encontradas de acordo com *GeneDB*.

Com o intuito de extrair o máximo de informação da análise de sequenciamento por *Shotgun* registrou-se o parâmetro de abundância relativa para cada proteína na amostra, denominado *emPAI*. Este índice permite uma análise comparativa de abundância relativa e, portanto torna-se útil para avaliação da qualidade da fração secretada, frente ao potencial de contaminação por constituintes citossólicos. Considerando que o somatório do índice *emPAI* corresponde a 100% do total de proteínas identificadas, as categorias contendo maior representatividade em termos de abundância foram o citoesqueleto (21%), metabolismo de nucleotídeos (17%) e atividade antioxidante (16%) e outros processos (16%), **Figura 15**.



**Figura 15:** Quantidade relativa de abundância (*emPAI*) das proteínas identificadas na fração 6h pH7.2.

Uma análise detalhada da categoria citoesqueleto mostrou que apenas duas proteínas ( $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas) contribuíram com 96,9% da quantidade total de proteínas desta classe. Este resultado sugere significativa contaminação do secretoma com os componentes majoritários do flagelo do parasito. Desta forma, excluindo da análise o citoesqueleto, as categorias funcionais que provavelmente refletem a composição real do secretoma estão envolvidas, em ordem decrescente de importância, com o metabolismo de nucleotídeos (22%), outros processos (21%) e atividade antioxidante (20%), **Figura 16**.



**Figura 16:** Quantidade relativa de abundância (*emPAI*) das proteínas identificadas na fração 6h pH7.2, excluindo-se a categoria citoesqueleto.

Após categorização em processos biológicos e determinação da abundância relativa das proteínas identificadas na fração secretada (6h pH 7.2/T 26°C), os componentes presentes em cinco categorias (resposta ao choque térmico, metabolismo de nucleotídeos, degradação protéica, atividade antioxidante e outros processos) foram submetidos à análises de bioinformática na busca de marcadores moleculares de sequência primária, indicativos de secreção celular.

As 83 proteínas descritas na **Tabela 3** foram submetidas à análise pelos algoritmos *SignalP*, *Sigcleave*, *SecretomeP*, *TMHMM* e *WoLF PSORT*. Os dados gerados pelos algoritmos *SignalP* demonstram a existência de peptídeos sinais e, portanto, secreção a partir de via clássica para cerca de 11% das proteínas analisadas. O *SecretomeP* indicou pelo menos 42 proteínas (50,60%) secretadas por vias clássicas e não-clássicas. Desta maneira, em se tratando de *Leishmania*, cerca de 44% das proteínas identificadas poderiam ser exportadas a partir de exossomos, glicossomos e vesículas apoptóticas. O algoritmo *TMHMM* detectou a presença de hélices transmembranas em cerca de 10% das proteínas; demonstrando localização na superfície do parasito. O *WoLF PSORT*, comumente utilizado para predição de localização celular, indicou apenas 9% de proteínas extracelulares e, desta forma, subestimou o número total de proteínas identificadas pela análise proteômica.

**Tabela 3:** Proteínas analisadas pelos algoritmos *SignalP*, *Sigcleave*, *SecretomeP*, *TMHMM* e *WoLF PSORT*.

Acesso	Identidade	<i>SignalP</i>	<i>Sigcleave</i>	<i>SecretomeP</i>	<i>TMHMM</i>	<i>WoLF PSORT</i>
<b>Resposta ao choque térmico</b>						
LinJ28_V3.2960	proteína de choque térmico hsp70					
LinJ33_V3.0360	proteína de choque térmico hsp83-1					
LinJ30_V3.2470	proteína 1 relacionada ao choque térmico 70					
LinJ18_V3.1350	proteína de choque térmico					
LinJ27_V3.2350	proteína de choque térmico DnaJ					
LinJ08_V3.1020	proteína sti1 induzida por estresse					
LinJ26_V3.1220	proteína relacionada a hsp70					
LinJ33_V3.2520	proteína do choque térmico					
<b>Metabolismo de nucleotídeos</b>						
LinJ32_V3.3100	nucleosídeo difosfato kinase b					
LinJ36_V3.6770	histidina fosfatase ácida secretada	x	x (3)		x	extr
LinJ05_V3.0830	metiltioadenosina fosforilase			x		
LinJ35_V3.2200	adenosina deaminase			x		
LinJ14_V3.0130	proteína semelhante a nucleosídeo hidrolase			x		
LinJ03_V3.0510	proteína hipotética					
<b>Degradação protéica</b>						
LinJ33_V3.2670	carboxipeptidase					
LinJ26_V3.1550	thimet oligopeptidase					
LinJ13_V3.0090	carboxipeptidase					
LinJ05_V3.0960	dipeptidil-peptidase III		x (1)			
LinJ29_V3.0860	cisteína peptidase C	x	x (6)	x	x	extr
LinJ35_V3.0770	proteína ativadora de proteassoma pa26					
LinJ34_V3.4390	subunidade beta 7 do proteassoma 20S			x		extr
LinJ21_V3.2070	subunidade alfa 2 do proteassoma			x		
LinJ14_V3.0910	cisteína peptidase semelhante a calpaína					
LinJ14_V3.0180	carboxipeptidase					
LinJ28_V3.0110	subunidade beta 3 do proteassoma					
LinJ02_V3.0710	peptidil-dipeptidase					
LinJ35_V3.2400	aminopeptidase P			x		
LinJ11_V3.0640	aminopeptidase					
LinJ35_V3.4910	subunidade alfa 1 do proteassoma					
LinJ12_V4.0030	subunidade beta 1 do proteassoma			x		
LinJ10_V3.0490	GP63		x (4)	x	x	

LinJ31_V3.0450	proteína CAP5.5 associada ao citoesqueleto								plas
LinJ19_V3.1460	cisteína protease A	x	x (1)	x		x			
LinJ31_V3.2060	proteína succinil-diaminopimelato semelhante a desuccinilase						x		
LinJ20_V3.1210	cisteína peptidase semelhante a calpaína						x		
LinJ29_V3.2350	aminopeptidase		x (1)	x					
LinJ33_V3.2700	aminopeptidase								
LinJ31_V3.3210	peptidase		x (2)	x					
<b>Atividade antioxidante</b>									
LinJ15_V3.1140	triparedoxina peroxidase						x		
LinJ15_V3.1100	triparedoxina peroxidase						x		
LinJ29_V3.1250	triparedoxina		x (1)	x					
LinJ23_V3.0050	peroxidoxina						x		
LinJ32_V3.1910	ferro superóxido dismutase								
LinJ05_V3.0350	tripanotiona redutase		x (1)	x					
LinJ08_V3.0300	ferro superóxido dismutase						x		
LinJ06_V3.1090	proteína dissulfido isomerase	x	x (3)	x					extr
LinJ33_V3.0260	redutase 1 dependente de thiol								
LinJ29_V3.1240	triparedoxina		x (1)	x					
LinJ27_V3.1770	tripanotiona sintetase								
LinJ36_V3.7280	proteína dissulfido isomerase	x	x (3)	x			x		extr
<b>Outros processos</b>									
LinJ31_V3.2210	prostaglandina 2 alfa sintase								
LinJ06_V3.0010	histona h4						x		
LinJ09_V3.1410	histona H2B						x		
LinJ25_V3.0940	ciclofilina a								
LinJ35_V3.2250	proteína de membrana do cinetoplastídeo 11						x		
LinJ15_V3.0010	histona h4						x		
LinJ09_V3.0970	calmodulina								
LinJ31_V3.1930	proteína de fusão de ubiquitina						x		
LinJ27_V3.0620	proteína rab1 ligante de GTP								
LinJ24_V3.1560	fator de liberação de histamina dependente de IgE						x		
LinJ10_V3.0900	fator de transporte nuclear 2						x		
LinJ29_V3.0520	proteína semelhante a cofilina						x		
LinJ06_V3.0120	ciclofilina	x	x(3)	x					extr
LinJ31_V3.2890	fator de ribosilação de adp						x		
LinJ31_V3.2670	calreticulina	x	x (1)					x	extr
LinJ28_V3.2940	receptor de proteína quinase c ativada								
LinJ31_V3.1070	biotina						x		plas
LinJ21_V3.1160	histona h2a								
LinJ10_V3.0920	histona h3						x		
LinJ19_V3.0190	proteína 1 carreadora de ATP							x	plas

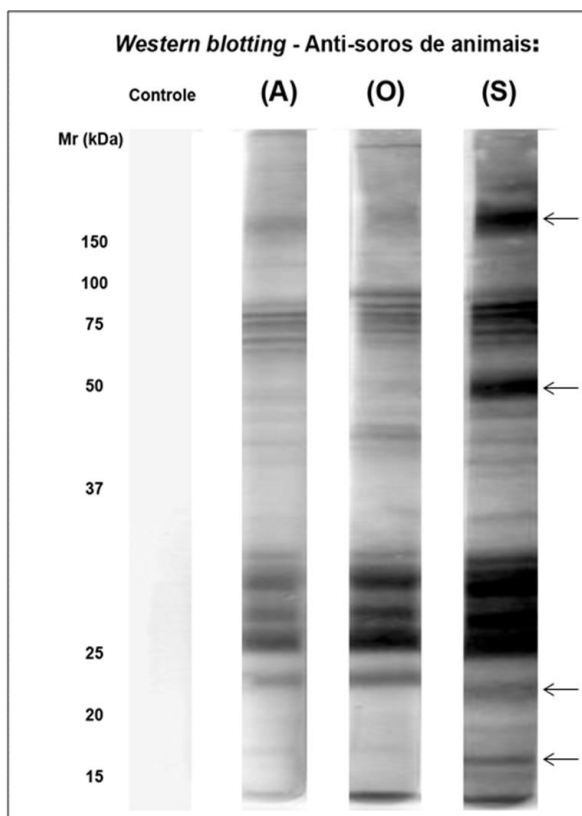
LinJ35_V3.3210	riboflavina quinase						x	
LinJ14_V3.1450	mio-inositol-1-fosfato sintase						x	extr
LinJ25_V3.1160	aldeído desidrogenase		x (1)				x	
LinJ13_V3.0160	subunidade regulatória da proteína quinase A			x (1)				
LinJ26_V3.2290	nitrilase						x	
LinJ34_V3.4360	isômero-d específico proteína hidroxíácido 2		x (1)				x	
LinJ33_V3.1470	proteína quinase ativada por mitógeno						x	
LinJ23_V3.1460	proteína 1 do complexo t, subunidade gama							
LinJ32_V3.0410	RNA helicase dependente de ATP							
LinJ31_V3.1240	pirofosfatase 1 de translocação de próton tipo vacuolar	x	x (3)			x	x	plas
LinJ28_V3.1310	proteína 78 regulada por glicose	x	x (5)				x	
LinJ26_V3.0910	proteína hipotética							

(x) presença; (-) ausência; (extr) extracelular; (plas) membrana plasmática. O valor entre parênteses indica a número de peptídeos sinais encontrado na sequência com *scores* significativos.

## 5.6 – Imunoproteômica

### 5.6.1 – Busca de marcadores para prognóstico e diagnóstico da infecção por *L.infantum*

Cerca de 5 µg da fração 6h pH 7.2/T 26°C foram separadas em gel SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. Soros de animais apresentando diferentes formas clínicas da LVC (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) juntamente com soros de cães controles (sadios) foram utilizados nos experimentos de *Western blotting*. O resultado mostrado na **Figura 17** permitiu concluir que a fração secretada de *L. infantum* é capaz de diferenciar os animais portadores de leishmaniose dos animais sadios. Além disso, as reatividades diferenciais, considerando a existência de bandas específicas e intensidade variada de reação, permitiram a discriminação dos animais sintomáticos dos demais grupos. Utilizando o soro de animais sintomáticos não foram observadas reatividades diferenciadas para os secretomas de *L. infantum*, obtidos a partir do cultivo nos pHs 5.5 e 7.2, **Figura Suplementar 1**.



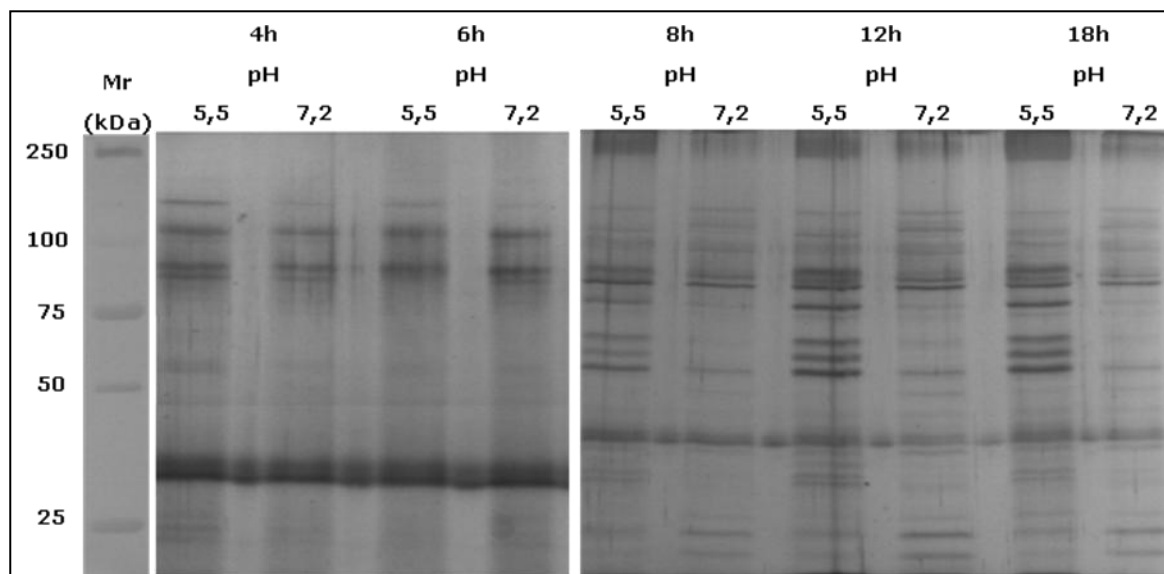
**Figura 17: Reatividade do secretoma de *L. infantum* frente aos soros de animais portadores de diferentes formas clínicas da LVC.** Aliquotas da fração secretada obtida pelo cultivo de *L. infantum* por 6h, pH 7.2 / T 26°C, foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. Incubação com soros de animais controles, assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e sintomáticos (S), seguido de detecção por anti-IgG de cão marcado com fosfatase alcalina e revelação por NBT/BCIP. As setas indicam bandas proteicas que poderiam ser utilizadas como marcadores de prognóstico da LVC.

### 5.6.2 – O secretoma de *L. amazonensis* como fonte alternativa de antígenos para o prognóstico e diagnóstico da LVC

Tomando por base o potencial de reatividade imunológica entre antígenos obtidos a partir de diferentes espécies de *Leishmania*, avaliou-se a possibilidade do emprego do secretoma de *L. amazonensis* como fonte alternativa para a busca de marcadores de prognóstico e diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Neste sentido, um isolado selvagem de *L. amazonensis* foi submetido às mesmas condições experimentais descritas para a obtenção do secretoma de *L. infantum*. O sobrenadante de cultura foi analisado em experimentos de *Western blotting* com o emprego de soros de cães naturalmente infectados portadores de diferentes formas clínicas da LVC.

O rendimento protéico do secretoma de *L. amazonensis* mostrou-se significativamente inferior ao obtido para *L. infantum*. A média de proteínas totais para dois experimentos independentes foi de 40 µg. A **Figura 18**, demonstra o perfil eletroforético em gel unidimensional das proteínas secretadas durante 4 a 18h de cultivo, após coloração pela prata. Observou-se um número reduzido de bandas protéicas durante as primeiras 6h de cultivo, as quais aumentaram consideravelmente em número e diversidade, a partir de 8h. Além disso, a

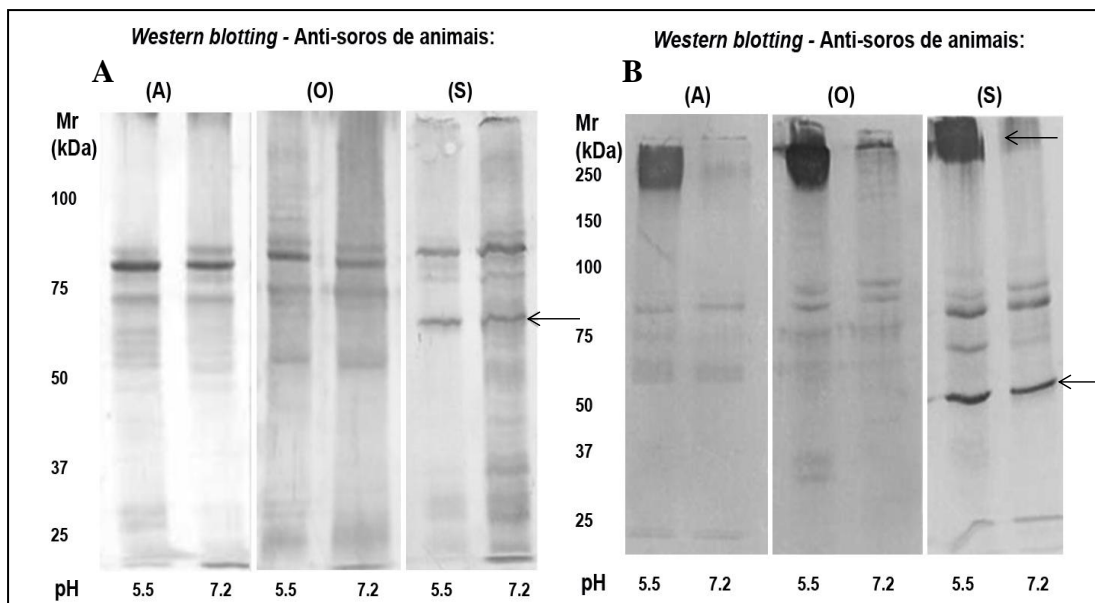
partir de 8h de cultivo foram observadas bandas protéicas diferencialmente presentes nos secretomas obtidos nos pHs 5.5 e 7.2. Este resultado preliminar sugere que *L. amazonensis* produz secretomas distintos quando submetida às diferentes condições de cultivo, o que não foi evidenciado durante análise do secretoma de *L. infantum*.



**Figura 18:** Perfil eletroforético unidimensional do secretoma de *L. amazonensis*. Alíquotas contendo cerca de 2 µg de proteínas secretadas foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. Coloração pela prata.

Cerca de 5 µg das frações secretadas de *L. amazonensis* foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. Soros de animais apresentando diferentes formas clínicas da LVC (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) juntamente com soros de cães controles (sadios) foram utilizados nos experimentos de *Western blotting*. As **Figuras 19A e 19B** mostram que a fração secretada de *L. amazonensis* é capaz de identificar animais portadores de LVC. Soros de animais sadios quando testados frente ao extrato total de *L. amazonensis* não mostraram reatividade (resultado não apresentado), sugerindo que este secretoma pode ser útil para discriminar entre animais sadios e doentes. Além disso, as reatividades diferenciais, considerando a existência de bandas específicas e intensidade variada de reação, permitiram a discriminação dos animais sintomáticos dos demais grupos. A partir de 8h de cultivo, em pH 5.5, foi observada uma intensa reatividade; particularmente associada ao aparecimento de uma banda proteica de massa molecular em torno de 250 kDa, **Figura 19B**. Esta proteína mostrou-se altamente imunogênica, sendo igualmente detectada pelos soros de animais portadores de diferentes formas clínicas da LVC. A caracterização molecular deste antígeno de *L. amazonensis* poderá fornecer alternativa para o aprimoramento biotecnológico dos testes de diagnóstico para a LVC.





**Figura 19: Reatividade do secretoma de *L. amazonensis* frente aos soros de animais portadores de diferentes formas clínicas da LVC.** Alíquotas das frações secretadas obtidas pelo cultivo de *L. amazonensis* durante 6h (A) e 8h (B) foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de PVDF. Incubação com soros de animais assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e sintomáticos (S); seguido de detecção por anti-IgG de cão marcado com fosfatase alcalina e revelação por NBT/BCIP. As setas indicam bandas proteicas que poderiam ser utilizadas como marcadores para prognóstico e diagnóstico da LVC.

## 6 – Discussão

A busca de marcadores da infecção por *Leishmania* constitui tema de grande relevância para a descoberta de antígenos a serem utilizados para o diagnóstico e prognóstico da doença. Além disso, considerando a inexistência de uma vacina cuja eficácia justifique o emprego em larga escala, a identificação de novas frações antigênicas ou a seleção de antígenos únicos é de interesse para o aprimoramento biotecnológico das vacinas anti-leishmaniose de segunda e terceira geração (Palatnik-de-Sousa, 2008; Reis *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011b). Neste sentido, esse trabalho pretendeu caracterizar a fração de proteínas secretadas de *L. infantum* com objetivo inicial de determinar sua composição e avaliar seu potencial para a descoberta de biomarcadores associados à LVC.

Tendo em vista a grande variabilidade genética do parasito, nossa primeira abordagem consistiu na utilização do método de análise molecular PCR-RFLP para a identificação inequívoca das espécies a serem investigadas. Com o emprego de iniciadores específicos para amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA, seguido de digestão com enzimas de restrição e separação dos fragmentos em gel de poliacrilamida 10%, foi possível a discriminação molecular entre as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;

através da observação de bandeamento específico de cada isolado. Esta abordagem utilizou *L. infantum* (cepa PP75) e um isolado de *L. amazonensis* de cepa indeterminada.

Inicialmente, a cepa PP75 de *L. infantum* foi cultivada e expandida em meio LIT até a 7ª passagem, a qual foi escolhida para obtenção das proteínas secretadas durante crescimento exponencial do parasito. O tempo de cultivo para análise de proteínas presentes no sobrenadante variou de 4 a 24h, com intervalos de coleta iniciais a cada 2 horas. Com esta estratégia foi possível avaliar a extensão de morte celular e, desta forma, avaliar o melhor tempo de cultivo associado com maior rendimento de proteínas secretadas e menor contaminação da fração com proteínas citossólicas provenientes de lise dos parasitos. O método utilizado para avaliação de lise celular foi marcação de DNA por iodeto de propídeo, seguido de análise por citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que já no tempo zero, a cultura de *Leishmania* possuiu em torno de 6% de parasitos com alterações morfológicas. Isso pode ser atribuído aos procedimentos necessários para a obtenção de uma cultura livre de proteínas séricas, provenientes do cultivo inicial em meio LIT. Entretanto, este percentual não sofreu alterações significativas ao longo de 8 horas de cultivo. Por outro lado, no tempo de 12 horas foi observado aumento significativo de lise celular (em torno de 28%) o que inviabilizou a utilização dessa fração para o estudo de proteínas secretadas por *L. infantum*. Silverman *et al.* (2008), utilizando ensaio de atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase como marcador de lise celular, padronizou o período de cultivo de 4 a 6h para análise do secretoma de *L. donovani* e o correlacionou a aproximadamente 5% de lise celular. Este dado nos permite concluir que a fração aqui denominada secretoma de *L. infantum* reúne constituintes comuns de secreção além de componentes intracelulares, descritos para outras espécies de *Leishmania*.

Outros parâmetros empregados para a obtenção do secretoma de *L. infantum* consistiram nas variações de pH e temperatura, durante o cultivo. Mantendo as condições normais de cultivo de formas promastigotas do parasito, utilizou-se o pH 7.2 e temperatura de 26°C (Chenik *et al.*, 2006). Além disso, com intuito de mimetizar parcialmente as condições de crescimento do parasito no interior do vacúolo fagolisossomal do macrófago foi empregado o cultivo em pH 5.5 e temperatura de 35°C, conforme descrito por Chenik *et al.* (2006). A partir da coleta de parasitos durante os diferentes tempos de cultivo, seguido da confecção de lâminas para análise morfológica, foram observadas formas amastigotas-símiles para os parasitos cultivados em pH 5.5. Em pH 7.2, as formas observadas eram exclusivamente promastigotas de aspecto afilado e fusiforme.

A análise do perfil eletroforético em gel unidimensional comparando o proteoma total de *L. infantum*, obtido por homogeneização das promastigotas em tampão de lise, com as duas frações de proteínas secretadas (pH 5.5/35°C e pH 7.2/26°C) revelou perfis distintos de proteínas. No entanto, entre as frações secretadas foi observado um perfil de bandamento muito similar. Este resultado sugere que nestas condições experimentais não existem variações marcantes no padrão de secreção pelo parasito. Silverman *et al.* (2010), encontraram resultados similares durante a caracterização de proteínas secretadas via exossomos em *L. donovani* e *L. major*. Por outro lado, estes dados não descartam a possibilidade da existência de proteínas secretadas diferencialmente por formas amastigotas e promastigotas; especialmente pela dificuldade técnica associada à simulação em mimetizar as condições reais do microambiente no fagolisossomo. Nesse trabalho, a fração secretada pH 7.2/26°C obtida durante 6h de cultivo foi a escolhida para os estudos de identificação e caracterização do secretoma de *L. infantum*.

A quantidade limitada de fração secretada, obtida pelo cultivo de *L. infantum* durante 6h, direcionou a escolha do método de análise proteômica empregado para identificação dos constituintes protéicos. A utilização de métodos clássicos como o gel bidimensional requer quantidades significativas de amostra, está sujeita a inúmeras variações técnicas e, dependendo do poder de resolução, não revela e, portanto, não permite a identificação de componentes de baixa abundância (Görg *et al.*, 2009). Desse modo, a estratégia escolhida envolveu digestão do secretoma em solução, seguido de separação dos peptídeos tripticos por cromatografia de fase reversa, acoplada a um espectrômetro de massas operando via ionização por *electrospray*. Esta abordagem é comumente denominada *Shotgun Proteomics* e oferece potencial para identificação em larga escala da maioria dos constituintes de uma amostra protéica complexa (Gilmore & Washburn, 2010).

No total, 135 proteínas apresentando Mascot® *scores* significativos foram identificadas como constituintes do secretoma de *L. infantum*. Utilizando as anotações já existentes no banco de dados ‘Genedb/*Leishmania*’ ou através de busca de identidade por homologia utilizando BLASTp, foi possível a classificação do secretoma do parasito em 9 categorias funcionais distintas e uma hipotética. Outro parâmetro avaliado na análise do Mascot® foi o índice *emPAI*, o qual fornece uma estimativa de abundância relativa para cada constituinte da amostra. O *emPAI* vem sendo utilizado amplamente desde 2005 com o intuito de agregar informação de quantificação às análises de *shotgun*, tomando por base a existência de uma relação linear entre o logaritmo da concentração protéica e a razão: número de

peptídeos observados/número de peptídeos potencialmente observáveis, no espectrômetro de massas (Ishihama *et al.*, 2005).

O agrupamento das proteínas utilizando o índice *emPAI* revelou que >60% das moléculas identificadas se enquadram em três categorias principais (1) metabolismo de nucleotídeos, (2) outros processos e (3) metabolismo de carboidratos. Para esta análise excluiu-se a categoria citoesqueleto haja visto que os principais constituintes identificados de alta abundância foram  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas e, sugerindo contaminação do secretoma com o flagelo do parasito. A discriminação entre proteínas genuinamente secretadas de contaminação citossólica, também foi apoiada pela utilização de ferramentas de bioinformática. Nesta análise 63 componentes pertencentes a 5 categorias (resposta ao choque térmico, metabolismo de nucleotídeos, degradação proteica, atividade antioxidante e outros processos), possivelmente envolvidas com secreção celular, foram submetidos aos algoritmos *SignalP*, *SecretomeP* e *TMHMM*. Destas, 37 (58%) foram classificadas como moléculas secretadas, com predomínio de proteínas exportadas a partir de vias não clássicas de secreção. Esses achados corroboram com aqueles já descritos para a caracterização do secretoma de outras espécies de *Leishmania* (Silverman *et al.*, 2008; Cuervo *et al.*, 2009). Apenas 6 componentes identificados pelo algoritmo *TMHMM* estão provavelmente localizados na membrana plasmática de *L. infantum*.

*A seguir, uma breve revisão sobre os principais componentes de cada categoria será apresentada, de modo a fornecer subsídios para o entendimento da função molecular associada ao secretoma de L. infantum.*

Utilizando o parâmetro de abundância relativa fornecido pela análise de sequenciamento, a categoria contendo proteínas do citoesqueleto representou a maior contribuição na análise do secretoma de *L. infantum*. Nesta categoria, as proteínas mais abundantes foram  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina. Três genes codificando para  $\beta$ -tubulina e 1 gene para  $\alpha$ -tubulina são descritos em *Leishmania* (Jackson *et al.*, 2006); nesta análise foram identificadas duas variantes de  $\beta$ -tubulina e a  $\alpha$ -tubulina. As tubulinas representam proteínas altamente abundantes em *Leishmania*, sendo responsáveis pela formação de microtúbulos, dímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina. Esses possuem um papel crucial na divisão celular, na manutenção da morfologia e motilidade, no deslocamento de vesículas e organelas e na orientação do cinetoplasto (Werbovets *et al.*, 1999; Havens *et al.*, 2000). A presença das tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$  na

amostra do secretoma de *L. infantum*, conforme sugerido anteriormente, pode ser atribuída em grande parte à contaminação da preparação com o flagelo do parasito.

Na segunda categoria de proteínas identificadas estão moléculas ligadas ao metabolismo de nucleotídeos dentre elas, a enzima nucleosídeo difosfato quinase b e a histidina fosfatase ácida secretada. A enzima nucleosídeo difosfato quinase (NdK) catalisa a transferência do fosfato do nucleosídeo trifosfato (NTP) para o nucleosídeo difosfato (NDP), mantendo níveis apropriados de NTP nas células. Além disso, está envolvida com a regulação da expressão gênica em células de mamíferos e participa das vias de salvação de purinas em tripanosomatídeos (Souza *et al.*, 2011). Além de seu papel intracelular na transferência de nucleotídeos, Kolli *et al* (2008) demonstraram que NdKb de *L. amazonensis*, é secretada para o meio externo, sendo capaz de provocar diminuição dos níveis de ATP extracelular (eATP). Acredita-se que este processo constitua passo determinante para o sucesso do parasito na infecção dos macrófagos, por preservar a integridade das células hospedeiras via diferentes rotas bioquímicas. O eATP é conhecido por induzir a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) dos macrófagos e por induzir citólise destes fagócitos via apoptose, através da ligação do ATP ao receptor purinérgico P2X<sub>7</sub> (Kolli *et al.*, 2008). Além desses efeitos, as NdK intracelular e extracelular de *Leishmania* podem, potencialmente, utilizar o ATP para a geração de outros nucleotídeos. NTPs, como GTP e UTP, são conhecidos por regular a expressão gênica do macrófago, tornando o microambiente celular favorável para o estabelecimento do parasitismo (Kolli *et al.*, 2008). A família da enzima histidina fosfatase ácida compreende fosfatases ácidas secretadas ou associadas à membrana, as quais promovem a defosforilação de substratos orgânicos. É conhecido que as promastigotas, da maioria das espécies de *Leishmania*, secretam fosfatases ácidas *in vitro* e que amastigotas de *L. donovani* sintetizam estas enzimas durante a infecção humana (Ellis *et al.*, 1998). Devido à alta homologia da sequência observada para a histidina fosfatase ácida entre as espécies de *Leishmania*, sugere-se que estas enzimas possuam um papel importante para a sobrevivência do parasito (Cuervo *et al.*, 2009). Apesar de sua função não estar totalmente esclarecida, Joshi *et al* (2004) demonstraram que a histidina fosfatase ácida retém sua atividade enzimática frente a diferentes enzimas proteolíticas, sugerindo um possível papel durante a colonização do parasito no intestino do inseto vetor.

Na terceira categoria mais abundante de proteínas estão moléculas relacionadas a vários processos celulares, sendo representada pela prostaglandina F<sub>2α</sub> sintase, proteína de membrana de cinetoplastídeo 11 (KMP-11), fator de liberação de histamina dependente de

IgE e receptor de proteína quinase c ativada (LACK). Tomando por base o amplo espectro de funções associadas aos eicosanóides produzidos por mamíferos, a descoberta de que alguns parasitos protistas e metazoários também possuem a capacidade de metabolizar o ácido araquidônico a prostanóides, instigou a abertura de importantes linhas de investigação. Em *Leishmania*, foi inicialmente demonstrado que extratos totais de formas promastigotas de *L. major*, *L. donovani* e *L. tropica* convertem ácido araquidônico a quantidades significativas de PGF<sub>2α</sub> (Kabututu *et al.*, 2003). Níveis reduzidos de PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> também foram detectados. Apesar do papel específico de PGF<sub>2α</sub> não ter sido elucidado, estudos tem mostrado que a infecção por *Leishmania* leva a um aumento dos níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), induzida pela COX através da via dependente de proteína quinase C, a qual favorece a persistência e a propagação de *Leishmania* (Kubata *et al.*, 2007). PGE<sub>2</sub> é um imunomodulador potente, indutor de inflamação, contribui para a patogênese de doenças parasíticas, modula a resposta imune do hospedeiro pela regulação negativa de citocinas, e permite ao parasito evadir do sistema imune do hospedeiro (Kubata *et al.*, 2007). Neste contexto, em tripanossomatídeos, tem sido proposto que os prostanóides produzidos pelos parasitos poderiam atuar como mediadores de *quorum sensing*, particularmente na fase aguda da infecção, de modo a prevenir proliferação exacerbada do parasito e, conseqüentemente morte do hospedeiro (Mukherjee *et al.*, 2011). A inabilidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune rápida durante a fase aguda é característica da infecção por *Leishmania* e pode estar ligada à participação de moléculas imunossupressoras como as PGs, favorecendo a instalação e persistência do parasitismo (Matte *et al.*, 2001). A proteína de membrana cinetoplastídeo 11 (KMP-11) é uma glicoproteína de superfície associada à LPG (lipofosfoglicano). KMP-11 é expressa em promastigotas e amastigotas e níveis aumentados de expressão são observados durante a metacicloênese (Matos *et al.*, 2010). Experimentos de localização demonstraram KMP-11 na membrana plasmática, na bolsa flagelar e em vesículas intracelulares (Stebeck *et al.*, 1995). Células de pacientes com leishmaniose tegumentar estimuladas com KMP-11 produzem altos níveis de IL-10, citocina responsável pela patogênese e persistência do parasito (Carvalho *et al.*, 2005). O receptor de proteína quinase C ativada (LACK) é essencial para a viabilidade do parasito e para seu estabelecimento no hospedeiro por atuar em vias de transdução de sinal. Através de sua ligação ao plasminogênio, LACK provavelmente participa de eventos determinantes para a invasão e/ou estabelecimento da infecção por *Leishmania* (Gómez-Arreaza *et al.*, 2011). Além de transdução de sinal, LACK participa de importantes processos celulares como controle do ciclo celular e processamento de RNA (Cuervo *et al.*,

2009). LACK é altamente secretada via exossomos em *L. donovani* (Silverman *et al.*, 2008, Silverman *et al.*, 2010).

Moléculas envolvidas com o metabolismo de carboidratos compõem a quarta categoria de proteínas identificadas na fração secretada de *L. infantum*. Considerando o índice de abundância relativa (*emPAI*) cerca de 37% das moléculas desta categoria são representadas por isoformas da enzima enolase. A enolase catalisa a conversão reversível de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, participando tanto da glicólise quanto da gliconeogênese (Verlinde *et al.*, 2001). Está localizada principalmente no citosol e participa da regulação da morfologia celular e do tráfico intracelular, por interação com o citoesqueleto (Avilan *et al.*, 2011). A principal função associada à presença de enolase no secretoma parece estar ligada ao fato da enzima ser considerada um receptor de plasminogênio. Após a ligação do plasminogênio à superfície celular ocorre a ativação da produção da protease plasmina, a qual aciona vários processos envolvidos em eventos fisiológicos e patológicos, como migração celular, ativação de colagenase e degradação de fibrina. A ligação de enolase ao plasminogênio facilita a invasão e o estabelecimento da infecção no hospedeiro em *L. mexicana* (Vanegas *et al.*, 2007). Outros autores identificaram enolase primeiramente como constituinte do secretoma de *L. donovani* (Silverman *et al.*, 2008) e, mais tarde como integrante de exossomos de *L. donovani* e *L. major* (Silverman *et al.*, 2010). De um modo geral, a via glicolítica tem sido alvo de estudo para a identificação de drogas anti-tripanosomatídeos, uma vez que existem diferenças importantes quando comparada à via em mamíferos. Diferenças de estrutura tridimensional e substituições de resíduos reativos têm sido relatadas. Além disso, sete enzimas glicolíticas, envolvidas na conversão de glicose a 3-fosfoglicerato, estão localizadas em organelas especializadas chamadas glicossomos (Verlinde *et al.*, 2001).

Na categoria atividade antioxidante, as proteínas mais abundantes foram peroxidoxina, triparedoxina peroxidase e tripanotiona redutase. Peroxidoxinas representam uma família de proteínas antioxidantes de alta abundância em células de helmintos e parasitos protozoários (McGonigle *et al.*, 1998). Estas proteínas reduzem o dano causado por peróxidos através da oxidação preferencial dos grupos sulfidril dos resíduos de cisteína conservados, de maneira dependente de tioredoxina (Levick *et al.*, 1998). Triparedoxina (TXN) é o termo usado para designar os membros da superfamília tioredoxina, encontrada exclusivamente em cinetoplastídeos. O termo TXN peroxidase designa todas as peroxidases que utilizam TXN como fonte para reduzir elétrons durante a remoção de peróxidos (Castro e Tomás, 2008). A

TXN peroxidase citosólica é crucial para a sobrevivência de *L. donovani* durante o estresse oxidativo, além de aumentar a infectividade do parasito e alterar sua capacidade de resposta a drogas (Iyer *et al.*, 2008). A enzima tripanotiona redutase está envolvida no metabolismo de tióis em tripanosomatídeos sendo responsável por manter níveis adequados de tripanotiona em sua forma reduzida para a remoção de espécies reativas de oxigênio (Castro-Pinto *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2011).

Na categoria degradação proteica, destacam-se as proteínas carboxipeptidase, *thimet* oligopeptidase, subunidades do proteassoma e GP63. A proteína carboxipeptidase juntamente com proteassomas e outras peptidases podem facilitar o crescimento da *Leishmania*, atuando na renovação do *pool* intracelular de aminoácidos, necessários durante a síntese proteica (Isaza *et al.*, 2008). *Thimet* oligopeptidases (TOP) são metalopeptidases citossólicas que hidrolisam oligopeptídeos contendo de 6 a 17 resíduos. Em extratos celulares, TOP são primariamente responsáveis por promover a degradação da maioria dos peptídeos produzidos por proteassomas (York *et al.*, 2003). Proteassomas são proteases multicatalíticas responsáveis pela principal atividade proteolítica citossólica de células eucariotas (Rock *et al.*, 1994). O centro catalítico, denominado proteassoma 20S, é constituído por quatro anéis de sete subunidades sobrepostos. Os dois anéis externos são formados por subunidades do tipo  $\alpha$  e os dois anéis internos são constituídos por subunidades do tipo  $\beta$ . Pelo menos três subunidades  $\beta$ , distintas, possuem atividades catalíticas semelhantes à tripsina, quimotripsina e caspase (Chu-Ping *et al.*, 1992). O proteassoma 20S pode se associar a complexos regulatórios formando, dentre outros, o proteassoma 26S. Esse último possui especificidade para proteínas marcadas com a ubiquitina e realiza proteólise dependente da hidrólise do ATP (Patel & Latterich, 1998). O proteassoma é essencial para o crescimento em *Leishmania*, devido à sua participação na regulação do ciclo celular do parasito (Robertson, 1999).

É provável que a secreção de algumas enzimas proteolíticas como proteassomas e oligopeptidases constitua parte importante de uma resposta ao estresse (Silverman *et al.*, 2008). Por outro lado, essas proteases podem ainda estar envolvidas em mecanismos de patogênese. O direcionamento de atividades proteolíticas para as enzimas de degradação residentes nos fagolisossomos poderia garantir a sobrevivência intracelular do parasito (Silverman *et al.*, 2008). Uma segunda possibilidade seria a hidrólise de moléculas de MHC-I e MHC-II, reduzindo a eficiência da apresentação de antígenos, conforme descrito para células infectadas por *Leishmania* (Beatty & Russell, 2000). A proteína GP63 ou leishmanolisina, considerada a mais abundante glicoproteína de superfície, é uma



metalo protease que protege o parasito dos efeitos citolíticos de vários peptídeos antimicrobianos (Lynn *et al.*, 2011). GP63 está envolvida na interação direta das promastigotas com o macrófago via complemento, facilitando a fagocitose do parasito sem promover lise do parasito. Esta proteína pode participar na clivagem de NF- $\kappa$ B, de proteínas tirosina fosfatases, além de atuar como uma proteína receptora de fibronectina (McGwire *et al.*, 2002). A secreção de GP63, por muitas espécies de *Leishmania*, parece refletir uma demanda comum de atividade proteolítica extracelular para o ciclo de vida do parasito (Contreras *et al.*, 2010).

Na categoria síntese proteica, as proteínas mais abundantes foram o fator de iniciação eucariótico 4a e o fator de alongação 2. O fator de iniciação eucariótico 4a pertence a uma subfamília de helicases dependente de ATP e está envolvido no estágio inicial da síntese proteica. Os membros dessa família estão implicados em todos os processos envolvendo RNA como transcrição, biogênese ribossomal, processamento de pré-RNA, exportação de RNA, tradução e degradação de RNA (Dhalia *et al.*, 2004; Barhoumi *et al.*, 2006). O fator de alongação 2, juntamente com o fator de alongação 1a e duas GTPases, conduz o ciclo de alongação da síntese proteica. Este fator é membro da superfamília proteínas G, e sofre mudanças conformacionais associadas com a ligação do nucleotídeo de guanosina e hidrólise de GTP (Kaul *et al.*, 2011). O papel destas proteínas no secretoma de *Leishmania* ainda permanece por ser elucidado.

Na categoria resposta ao choque térmico, as proteínas mais abundantes identificadas foram HSP-70 e HSP-83.1. As proteínas de choque térmico, ou de resposta ao estresse celular, embora possuam um importante papel na termotolerância, também estão envolvidas em vias bioquímicas essenciais na ausência do estresse. Dentre elas destacam-se o enovelamento de proteínas recém-sintetizadas e apresentação de antígenos (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Campos *et al.*, 2008). O papel destas moléculas, quando presentes no meio extracelular, parece estar ligado à funções imunoregulatórias como o estímulo da produção de citocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão (Pockley, 2003; Kaur *et al.*, 2011a). A família HSP-70 tem sido implicada na translocação de proteínas através da membrana mitocondrial e do retículo endoplasmático, na secreção das células e no processamento de antígenos nos macrófagos; além do potencial em estimular as respostas inata e antígeno-específico (Kaur *et al.*, 2011b). A proteína HSP-83 de *Leishmania* corresponde à HSP-90 em mamíferos e está envolvida com a regulação negativa de apoptose em mitocôndria, resultando em implicação direta com mecanismos de resistência à drogas (Vergnes *et al.*, 2007). HSP70

e HSP83.1 são alvos de pesquisas envolvendo busca por novas preparações e adjuvantes para vacinas por induzirem potente resposta imune (Angel *et al.*, 1996; Kaur *et al.*, 2011a). Silverman *et al* (2010) utilizaram as proteínas HSP-70, HSP-83 e o fator de alongação 1 $\alpha$  (ef-1 $\alpha$ ) como marcadores de secreção mediada por exossomo em *L. donovani*. Nossos resultados sugerem que estas proteínas poderiam estar presentes no interior de exossomos sendo secretadas por esta mesma via em *L. infantum*.

Na categoria metabolismo de aminoácidos, destacam-se as proteínas cistationina (cistationina) gama liase e arginase. A enzima cistationina gama liase converte cistationina a cisteína. A disponibilidade de cisteína interfere na síntese de glutathione e, portanto, de tripanotona, um fator de crescimento essencial para os tripanosomatídeos pelo seu papel no equilíbrio redox celular (Williams *et al.*, 2009b). A arginase é a principal enzima envolvida na geração de L-ornitina em tripanosomatídeos. A biossíntese de poliaminas em *Leishmania* começa com L-arginina, proveniente do hospedeiro, a qual é transportada para glicossomos por um mecanismo de permeação ainda não totalmente elucidado. Depois de sofrer hidrólise pela arginase, a ornitina é lançada de volta ao citosol para a conversão à putrescina e espermidina, as quais promovem a proliferação do parasito (Roberts *et al.*, 2004). Os macrófagos são atraídos pelas formas amastigotas, as quais expõem fosfatidilserina em sua membrana plasmática. A interação desta molécula com o receptor de fosfatidilserina do macrófago aumenta a produção de TGF- $\beta$ . Esta citocina, por sua vez, eleva a expressão de arginase. A arginase consome L-arginina, diminuindo a produção de óxido nítrico, e estimula a síntese de poliaminas. Isto facilita tanto a sobrevivência quanto a proliferação do parasito dentro dos macrófagos (Balaña-Fouce *et al.*, 2011).

A última abordagem desse trabalho consistiu na utilização do secretoma de *L. infantum* para avaliação de seu potencial biotecnológico na identificação de marcadores de prognóstico e diagnóstico da infecção. A partir de uma coleção de soros de cães pertencentes a diferentes formas clínicas da LVC (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) e *Western blotting* foi possível a observação de diferenças qualitativas na reatividade dos diferentes soros frente ao secretoma de *L. infantum*. Mesmo considerando o baixo poder de resolução do gel unidimensional, as diferenças mais evidentes poderiam ser úteis para discriminar entre animais assintomáticos e oligossintomáticos de sintomáticos. Além disso, soros de animais assintomáticos foram capazes de reconhecer várias proteínas antigênicas na fração do secretoma; demonstrando uma possível aplicação para o diagnóstico desta forma clínica de LVC.

Diferenças significativas de reatividade imunológica foram observadas quando soros de animais clinicamente diagnosticados com LVC foram testados contra proteínas secretadas por *L. amazonensis*. Particularmente, observou-se uma reatividade acentuada para o animal sintomático, o que poderia servir para discriminar este animal das outras formas clínicas. Além disso, foi demonstrado no secretoma de *L. amazonensis* após 8h de cultivo em pH 5.5, uma proteína altamente imunogênica de elevada massa molecular para a qual foram observados anticorpos circulantes em todas as formas clínicas da doença. De maneira similar, a análise do secretoma de *L. amazonensis* ofereceu a possibilidade de identificação do animal assintomático, para o qual os testes de diagnóstico existentes carecem de sensibilidade e especificidade.

## 7 - Conclusão

- A estratégia experimental adotada para obtenção das proteínas secretadas de *L. infantum* e *L. amazonensis* resultou em preparações apresentando bom enriquecimento do secretoma; comparável àqueles descritos para outras espécies de *Leishmania*;
- A análise proteômica permitiu a identificação dos constituintes, aliada à quantificação relativa dos mesmos no secretoma total de *L. infantum*. Isto possibilitou a discriminação das proteínas mais abundantes e, conseqüentemente, dos principais processos biológicos associados ao secretoma do parasito;
- As proteínas secretadas por *L. infantum* desempenham papéis essenciais na manutenção da relação parasito-hospedeiro. Dentre eles destacam-se mecanismos de modulação da resposta imune, sobrevivência intra/extracelular e proliferação do parasito;
- Os secretomas de *L. infantum* e *L. amazonensis* possuem antígenos com o potencial para avaliação de prognóstico em animais portadores de LVC. As duas frações constituem ainda fonte de moléculas promissoras para o diagnóstico da infecção e aprimoramento biotecnológico de preparações vacinais.

## 8 - Perspectivas

A caracterização molecular do secretoma de *L. infantum* abre novas possibilidades de investigação relacionadas ao tratamento, prognóstico e diagnóstico da LVC. As várias moléculas com atividade enzimática identificadas podem constituir alvos futuros para o desenho racional de novos medicamentos contra o parasito. Conforme observado, proteínas imunogênicas presentes no secretoma são reconhecidas pelos animais portadores de diferentes formas clínicas da infecção. Este achado é de interesse biotecnológico pois a utilização deste subproteoma, reduz a complexidade antigênica e, portanto, viabiliza a busca por novos marcadores da infecção.

Os resultados preliminares de imunoproteômica estimulam estudos epidemiológicos para definir parâmetros de especificidade e sensibilidade em testes diagnósticos, sensibilizados com o secretoma de *L. infantum* e *L. amazonensis*. A identificação das proteínas mais reativas poderá contribuir como fontes alternativas de antígenos recombinantes e desenho de peptídeos para fins vacinais, de prognóstico e diagnóstico da LVC.

## 9 – Referências

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L. F., and Jaffe, C. L. (1991) An experimental model for canine visceral leishmaniasis, *Parasite immunology* 13, 537-550.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., and *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science (New York, N.Y)* 287, 2185-2195.
- Adu-Bobie, J., Capecchi, B., Serruto, D., Rappuoli, R., and Pizza, M. (2003) Two years into reverse vaccinology, *Vaccine* 21, 605-610.
- Alencar, J. E., and Neves, J. (1982) Leishmaniose visceral (Calazar), *Doenças infecciosas e parasitárias*, edited by R. Veronesi, 724-738. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., and Nieto, J. (2004) Canine leishmaniasis, *Advances in parasitology* 57, 1-88.
- Anderson, N. L., and Anderson, N. G. (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words, *Electrophoresis* 19, 1853-1861.
- Angel, S. O., Requena, J. M., Soto, M., Criado, D., and Alonso, C. (1996) During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response, *Acta tropica* 62, 45-56.
- Arias, J. R., Monteiro, P. S., and Zicker, F. (1996) The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil, *Emerging infectious diseases* 2, 145-146.
- Ashford, R. W. (1996) Leishmaniasis reservoirs and their significance in control, *Clinics in dermatology* 14, 523-532.
- Ashford, R. W. (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses, *International journal for parasitology* 30, 1269-1281.
- Avilan, L., Gualdrón-Lopez, M., Quinones, W., Gonzalez-Gonzalez, L., Hannaert, V., Michels, P. A., and Concepcion, J. L. (2011) Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target, *Enzyme research* 2011, 932549.
- Ayalew, S., Confer, A. W., Hartson, S. D., and Shrestha, B. (2010) Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of *Mannheimia haemolytica* and identification of potential vaccine candidates, *Proteomics* 10, 2151-2164.
- Balaña-Fouce, R., Calvo-Alvarez, E., Alvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Perez-Pertejo, Y., and Reguera, R. M. (2011) Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis, *Molecular and biochemical parasitology*.

Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., and Ferrer, L. (2008) Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one, *Trends in parasitology* 24, 324-330.

Barhoumi, M., Tanner, N. K., Banroques, J., Linder, P., and Guizani, I. (2006) *Leishmania infantum* LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast, *The FEBS journal* 273, 5086-5100.

Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T., and Roy, S. (2005) Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis, *J Immunol* 174, 7160-7171.

Beatty, W. L., and Russell, D. G. (2000) Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages, *Infection and immunity* 68, 6997-7002.

Boarino, A., Scalone, A., Gradoni, L., Ferroglio, E., Vitale, F., Zanatta, R., Giuffrida, M. G., and Rosati, S. (2005) Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis, *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 12, 647-653.

Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da Silva, V. O., Paraguai de Souza, E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., and Palatnik de Sousa, C. B. (2002) Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN), *Vaccine* 20, 3277-3284.

Campos, R. M., Nascimento, M., Ferraz, J. C., Pereira, M. M., Rocha, P. O., Thompson, G. M., Cysne-Finkelstein, L., Figueiredo, R. C., and de Melo Neto, O. P. (2008) Distinct mitochondrial HSP70 homologues conserved in various *Leishmania* species suggest novel biological functions, *Molecular and biochemical parasitology* 160, 157-162.

Campos-Neto, A., Porrozzi, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Seiky, Y. A., Reed, S. G., and Grimaldi, G., Jr. (2001) Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease, *Infection and immunity* 69, 4103-4108.

Campos-Neto, A., Webb, J. R., Greeson, K., Coler, R. N., Skeiky, Y. A., and Reed, S. G. (2002) Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice, *Infection and immunity* 70, 2828-2836.

Capecchi, B., Serruto, D., Adu-Bobie, J., Rappuoli, R., and Pizza, M. (2004) The genome revolution in vaccine research, *Current issues in molecular biology* 6, 17-27.

Cardenas, R., Sandoval, C. M., Rodriguez-Morales, A. J., and Vivas, P. (2008) Zoonoses and climate variability, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 326-330.

Carrera, L., Fermin, M. L., Tesouro, M., Garcia, P., Rollan, E., Gonzalez, J. L., Mendez, S., Cuquerella, M., and Alunda, J. M. (1996) Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers, *Experimental parasitology* 82, 139-146.

Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J. M., Lopez, M. C., Alvar, J., and Moreno, J. (2008) Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis, *Vaccine* 26, 1902-1911.

Carvalho, L. P., Passos, S., Dutra, W. O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K. J., Carvalho, E. M., and Ribeiro de Jesus, A. (2005) Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients, *Scandinavian journal of immunology* 61, 337-342.

Castro, H., and Tomas, A. M. (2008) Peroxidases of trypanosomatids, *Antioxidants & redox signaling* 10, 1593-1606.

Castro-Pinto, D. B., Genestra, M., Menezes, G. B., Waghabi, M., Goncalves, A., De Nigris Del Cistia, C., Sant'Anna, C. M., Leon, L. L., and Mendonca-Lima, L. (2008) Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species, *Archives of microbiology* 189, 375-384.

Chenik, M., Lakhal, S., Ben Khalef, N., Zribi, L., Louzir, H., and Dellagi, K. (2006) Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania major* parasites, *Parasitology* 132, 493-509.

Chu-Ping, M., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N. (1992) Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain), *Biochimica et biophysica acta* 1119, 303-311.

Contreras, I., Gomez, M. A., Nguyen, O., Shio, M. T., McMaster, R. W., and Olivier, M. (2010) *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63, *PLoS pathogens* 6, e1001148.

Corrales, R. M., Mathieu-Daude, F., Garcia, D., Breniere, S. F., and Sereno, D. (2010) An experimental approach for the identification of conserved secreted proteins in trypanosomatids, *Journal of biomedicine & biotechnology*, 752698.

Costa, C. H., and Vieira, J. B. (2001) Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, 223-228.

Costa, M. M., Andrade, H. M., Bartholomeu, D. C., Freitas, L. M., Pires, S. F., Chapeaurouge, A. D., Perales, J., Ferreira, A. T., Giusta, M. S., Melo, M. N., and Gazzinelli, R. T. (2011a) Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. *Journal of proteome research* 10, 2172-2184.



- Costa, C. H., Peters, N. C., Maruyama, S. R., de Brito, E. C., Jr., and Santos, I. K. (2011b) Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda, *PLoS neglected tropical diseases* 5, e943.
- Cuervo, P., De Jesus, J. B., Saboia-Vahia, L., Mendonca-Lima, L., Domont, G. B., and Cupolillo, E. (2009) Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes, *Journal of proteomics* 73, 79-92.
- Cuervo, P., Domont, G. B., and De Jesus, J. B. (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance, *Journal of proteomics* 73, 845-867.
- Dantas-Torres, F., and Brandao-Filho, S. P. (2006) Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 48, 151-156.
- Deane, L. M., and Deane, M. P. (1954) Isolation of leishmaniae in the viscera and the skin of a fox in the kala-azar endemic zone in Sobral, Ceara. *Hospital (Rio de Janeiro, Brazil)* 45, 419-421.
- Deane, L. M., and Deane, M. P. (1955) Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará, *Hospital* 47, 75-87.
- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U. (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 463-469.
- Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis, *Nature reviews* 2, 692.
- Dhalia, R., Reis, C. R., Freire, E. R., Rocha, P. O., Katz, R., Muniz, J. R., Standart, N., and de Melo Neto, O. P. (2005) Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues, *Molecular and biochemical parasitology* 140, 23-41.
- Dreger, M. (2003) Proteome analysis at the level of subcellular structures, *European journal of biochemistry / FEBS* 270, 589-599.
- Dumonteil, E. (2009) Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania species* in the post-genomic era, *Infect Genet Evol* 9, 1075-1082.
- Dunan, S., Frommel, D., Monjour, L., Ogunkolade, B. W., Cruz, A., and Quilici, M. (1989) Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis, *Parasite immunology* 11, 397-402.
- Ellis, S. L., Shakarian, A. M., and Dwyer, D. M. (1998) *Leishmania*: amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection, *Experimental parasitology* 89, 161-168.
- Ferreira Ede, C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M. (2007) Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146, 235-241.

- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., and *et al.* (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd, *Science* 269, 496-512.
- Forgber, M., Basu, R., Roychoudhury, K., Theinert, S., Roy, S., Sundar, S., and Walden, P. (2006) Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology, *PLoS one* 1, e40.
- Genaro, O. (1993) Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado, 202p.
- Genaro, O., de Toledo, V. P., da Costa, C. A., Hermeto, M. V., Afonso, L. C., and Mayrink, W. (1996) Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil, *Clinics in dermatology* 14, 503-512.
- Ghosh, A., Zhang, W. W., and Matlashewski, G. (2001) Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections, *Vaccine* 20, 59-66.
- Gilmore, J. M., and Washburn, M. P. (2010) Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes, *Journal of proteomics* 73, 2078-2091.
- Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Genaro, O., Carneiro, C. M., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., and Reis, A. B. (2006) Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci, *Journal of comparative pathology* 135, 100-107.
- Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., de Souza, J. V., das Dores Moreira, N., Malaquias, L. C., Mota e Castro, L. L., de Lana, M., and Reis, A. B. (2007) Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs, *Vaccine* 25, 7674-7686.
- Giunchetti, R. C., Reis, A. B., da Silveira-Lemos, D., Martins-Filho, O. A., Correa-Oliveira, R., Bethony, J., Vale, A. M., da Silva Quetz, J., Bueno, L. L., Franca-Silva, J. C., Nascimento, E., Mayrink, W., and Fujiwara, R. T. (2008) Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis, *Research in veterinary science* 85, 106-112.
- Gomes, D. C., Pinto, E. F., de Melo, L. D., Lima, W. P., Larraga, V., Lopes, U. G., and Rossi-Bergmann, B. (2007) Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice, *Vaccine* 25, 2168-2172.
- Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. A., Abath, F. G., and Alves, L. C. (2008) Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances, *Vet J* 175, 45-52.
- Gomez-Arreaza, A., Acosta, H., Barros-Alvarez, X., Concepcion, J. L., Albericio, F., and Avilan, L. (2011) *Leishmania mexicana*: LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein, *Experimental parasitology* 127, 752-761.

Gontijo, C. M. F, and Melo, M. N. (2004) Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 3, 338-349.

Gopfert, U., Goehring, N., Klein, C., and Ilg, T. (1999) Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Molecular cloning and characterization of the *Leishmania mexicana* ppg2 gene encoding the proteophosphoglycans aPPG and pPPG2 that are secreted by amastigotes and promastigotes, *The Biochemical journal* 344 Pt 3, 787-795.

Gorg, A., Drews, O., Luck, C., Weiland, F., and Weiss, W. (2009) 2-DE with IPGs, *Electrophoresis* 30 Suppl 1, S122-132.

Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., and Oliva, G. (2005) Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals, *Vaccine* 23, 5245-5251.

Grimaldi, G., and Tesh, R. B. (1993) Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 230-250.

Guerfali, F. Z., Ben-Abdallah, H., Sghaier, R. M., Ben-Aissa, K., Mkannez, G., Attia, H., and Laouini, D. (2009) An in silico immunological approach for prediction of CD8+ T cell epitopes of *Leishmania major* proteins in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 murine models of infection, *Infect Genet Evol* 9, 344-350.

Handman, E., Button, L. L., and McMaster, R. W. (1990) *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice, *Experimental parasitology* 70, 427-435.

Handman, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development, *Clinical microbiology reviews* 14, 229-243.

Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein, *Science (New York, N.Y)* 295, 1852-1858.

Havens, C. G., Bryant, N., Asher, L., Lamoreaux, L., Perfetto, S., Brendle, J. J., and Werbovetz, K. A. (2000) Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*, *Molecular and biochemical parasitology* 110, 223-236.

Herrera-Najera, C., Pina-Aguilar, R., Xacur-Garcia, F., Ramirez-Sierra, M. J., and Dumonteil, E. (2009) Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates, *Proteomics* 9, 1293-1301.

Holzmuller, P., Cavaleyra, M., Moreaux, J., Kovacic, R., Vincendeau, P., Papierok, G., and Lemesre, J. L. (2005) Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis, *Veterinary immunology and immunopathology* 106, 247-257.

Isaza, C. E., Zhong, X., Rosas, L. E., White, J. D., Chen, R. P., Liang, G. F., Chan, S. I., Satoskar, A. R., and Chan, M. K. (2008) A proposed role for *Leishmania major*

carboxypeptidase in peptide catabolism, *Biochemical and biophysical research communications* 373, 25-29.

Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (*emPAI*) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein, *Mol Cell Proteomics* 4, 1265-1272.

Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., and et al. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*, *Science (New York, N.Y)* 309, 436-442.

Iyer, J. P., Kaprakkaden, A., Choudhary, M. L., and Shaha, C. (2008) Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence, *Molecular microbiology* 68, 372-391.

Jackson, A. P., Vaughan, S., and Gull, K. (2006) Comparative genomics and concerted evolution of beta-tubulin paralogs in *Leishmania* spp, *BMC genomics* 7, 137.

Joshi, M. B., Mallinson, D. J., and Dwyer, D. M. (2004) The human pathogen *Leishmania donovani* secretes a histidine acid phosphatase activity that is resistant to proteolytic degradation, *The Journal of eukaryotic microbiology* 51, 108-112.

Kaul, G., Pattan, G., and Rafeequi, T. (2011) Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation, *Cell biochemistry and function* 29, 227-234.

Kaur, J., Kaur, T., and Kaur, S. (2011a) Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice, *Acta tropica* 119, 50-56.

Kaur, T., Sobti, R. C., and Kaur, S. (2011b) Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice, *Parasite immunology* 33, 95-103.

Kolli, B. K., Kostal, J., Zaborina, O., Chakrabarty, A. M., and Chang, K. P. (2008) *Leishmania*-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages, *Molecular and biochemical parasitology* 158, 163-175.

Kubata, B. K., Duszenko, M., Martin, K. S., and Urade, Y. (2007) Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites, *Trends in parasitology* 23, 325-331.

Kabututu, Z., Martin, S. K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C. J., Duszenko, M., Lazarus, M., Thuita, L. W., Urade, Y., and Kubata, B. K. (2003) Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*, *International journal for parasitology* 33, 221-228.

Lainson, R., and Shaw, J.J. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. (Ed.). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, 1-120.

- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., and et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409, 860-921.
- Lemesre, J. L., Holzmuller, P., Cavaleyra, M., Goncalves, R. B., Hottin, G., and Papierok, G. (2005) Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes, *Vaccine* 23, 2825-2840.
- Lemesre, J. L., Holzmuller, P., Goncalves, R. B., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleyra, M., and Papierok, G. (2007) Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial, *Vaccine* 25, 4223-4234.
- Levick, M. P., Tetaud, E., Fairlamb, A. H., and Blackwell, J. M. (1998) Identification and characterisation of a functional peroxidin from *Leishmania major*, *Molecular and biochemical parasitology* 96, 125-137.
- Lopez, J. L. (2007) Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis, *Journal of chromatography* 849, 190-202.
- Lynn, M. A., Kindrachuk, J., Marr, A. K., Jensen, H., Pante, N., Elliott, M. R., Napper, S., Hancock, R. E., and McMaster, W. R. (2011) Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role of leishmanolysin in parasite survival, *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1141.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., and et al. (1988) Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82(4), 566-567.
- Matos, D. C., Faccioli, L. A., Cysne-Finkelstein, L., Luca, P. M., Corte-Real, S., Armoa, G. R., Lemes, E. M., Decote-Ricardo, D., and Mendonca, S. C. (2010) Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 341-347.
- Matte, C., Maion, G., Mourad, W., and Olivier, M. (2001) *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis, *Parasite immunology* 23, 177-184.
- Mauel, J. (2002) Vaccination against *Leishmania* infections, *Current drug targets* 2, 201-226.
- Mayrink, W., Genaro, O., Dias, M., da Costa, C. A., Michalick, M. S., Melo, M. N., Williams, P., da Costa, R. T., Nascimento, E., & Oliveira, L. A. (1990). Vaccination of dogs against *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 32, 67-69.
- Mayrink, W., Genaro, O., Silva, J. C., da Costa, R. T., Tafuri, W. L., Toledo, V. P., da Silva, A. R., Reis, A. B., Williams, P., and da Costa, P. W. (1996) Phase I and II open clinical trials

of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 695-697.

McGonigle, S., Dalton, J. P., and James, E. R. (1998) Peroxidoxins: a new antioxidant family, *Parasitology today (Personal ed 14)*, 139-145.

McGwire, B. S., O'Connell, W. A., Chang, K. P., and Engman, D. M. (2002) Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence, *The Journal of biological chemistry* 277, 8802-8809.

Melby, P.C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L.E. and Cheng, J. (2001) *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 69, 4719-4725.

Mendez, S., Belkaid, Y., Seder, R. A., and Sacks, D. (2002) Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis, *Vaccine* 20, 3702-3708.

Mettler, M., Grimm, F., Naucke, T. J., Maasjost, C., and Deplazes, P. (2005) Canine leishmaniosis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs, *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 118, 37-44.

Ministério da Saúde (2003) Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 122p.

Ministério da Saúde (2006) Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 122p.

Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., and Baneth, G. (2008) Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two, *Trends in parasitology* 24, 371-377.

Molano, I., Alonso, M. G., Miron, C., Redondo, E., Requena, J. M., Soto, M., Nieto, C. G., and Alonso, C. (2003) A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*, *Veterinary immunology and immunopathology* 92, 1-13.

Molina, R., Amela, C., and et al. (1994) Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(4), 491-493.

Mohebali, M., Fallah, E., Jamshidi, S., and et al. (1998) Vaccine trial against canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal* 4, 234-238.

Moreira, M. A., Luvizotto, M. C., Garcia, J. F., Corbett, C. E., and Laurenti, M. D. (2007) Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs, *Veterinary parasitology* 145, 245-252.

Mukherjee, S., Machado, F. S., Huang, H., Oz, H. S., Jelicks, L. A., Prado, C. M., Koba, W., Fine, E. J., Zhao, D., Factor, S. M., Collado, J. E., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., and Ashton, A. W. (2011) Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease, *PloS one* 6, e16959.

Naderer, T., and McConville, M. J. (2008) The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective, *Cellular microbiology* 10, 301-308.

Nadim, A., Javadian, E., Tahvildar-Bidrui, G., Ghorbani, M. (1983) Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc. Pathol. Exot. Filiales* 76, 377-83.

Nickel, W. (2010) Pathways of unconventional protein secretion. *Current opinion in biotechnology* 21, 621-626.

Paape, D., and Aebischer, T. (2011) Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development, *Journal of proteomics* 74, 1614-1624.

Paape, D., Barrios-Llerena, M. E., Le Bihan, T., Mackay, L., and Aebischer, T. (2010) Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*, *Molecular and biochemical parasitology* 169, 108-114.

Palatnik-de-Souza, C. B., Santos, W. R., França Silva, J. C., Costa, R. T., Barbosa Reis, A., Palatnik, M., Mayrink, W., Genaro, O. (2001) Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 510–517.

Palatnik-de-Souza, C. B. (2008) Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709-1724.

Patel, S., and Latterich, M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions, *Trends in cell biology* 8, 65-71.

Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., and et al. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease, *Nature genetics* 39, 839-847.

Pessoa, S. B., and Pestana, B. R. (1940) Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germes mortos. *Rev. Biol. Hig.* 10, 112-118.

Peters, N., and Sacks, D. (2006) Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells, *Immunological reviews* 213, 159-179.

Pockley, A. G. (2003) Heat shock proteins as regulators of the immune response, *Lancet* 362, 469-476.

Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., and Larraga, V. (2003) Protection in dogs against visceral

leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK, *Vaccine* 21, 2474-2484.

Reis, A. B. (2001) Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado, 180p.

Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., and et al. (2006a) Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 81(1), 68-75.

Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A. M., Marques, M. J., Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Guerra, L. L., Andrade, R. A., Correa-Oliveira, R., and Martins-Filho, O. A. (2006b) Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Veterinary immunology and immunopathology* 112, 102-116.

Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., and et al. (2009) Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128(1-3), 87-95.

Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Carrillo, E., Martins-Filho, O. A., and Moreno, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis, *Trends in parasitology* 26, 341-349.

Reithinger, R., and Davies, C. R. (2002) Canine leishmaniasis: novel strategies for control, *Trends in parasitology* 18, 289-290.

Riera, C., Fisa, R., Udina, M., Gallego, M., and Portus, M. (2004) Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 102-110.

Roberts, S. C., Tancer, M. J., Polinsky, M. R., Gibson, K. M., Heby, O., and Ullman, B. (2004) Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants, *The Journal of biological chemistry* 279, 23668-23678.

Robertson, C. D. (1999) The *Leishmania mexicana* proteasome, *Molecular and biochemical parasitology* 103, 49-60.

Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A. L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules, *Cell* 78, 761-771.

Ross, R. (1903) Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal* 2, 1261-1262.



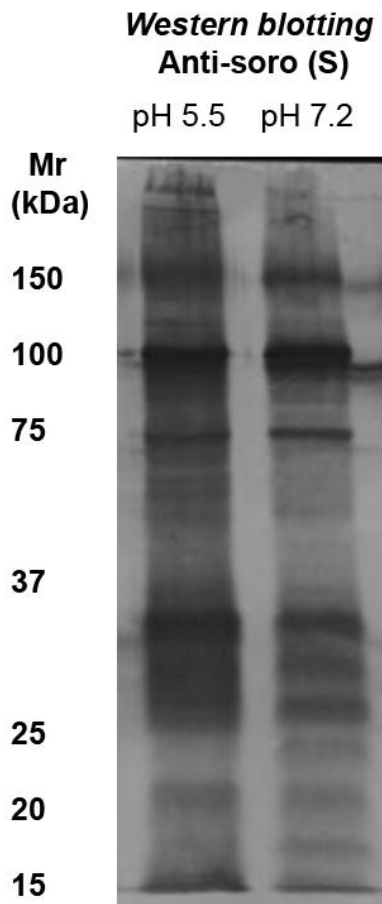
- Saldarriaga, O. A., Travi, B. L., Park, W., Perez, L. E., and Melby, P. C. (2006) Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs, *Vaccine* 24, 1928-1940.
- Salles-Gomes, L. (1939) Intradermo-reação de Monte Negro na Leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil-México*. 49, 5-15.
- Santos, F.R., Pena, S.D., Epplen, J.T. (1993) Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetics* 90, 655-656.
- Schatzmayr, H. G. (2003) New perspectives in viral vaccines, *Historia, ciencias, saude--Manguinhos* 10, 655-669.
- Serruto, D., and Rappuoli, R. (2006) Post-genomic vaccine development, *FEBS letters* 580, 2985-2992.
- Shukla, A. K., Patra, S., and Dubey, V. K. (2011) Biophysical and folding parameters of trypanothione reductase from *Leishmania infantum*, *Applied biochemistry and biotechnology* 165, 13-23.
- Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J., and Reiner, N. E. (2008) Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*, *Genome biology* 9, R35.
- Silverman, J. M., Clos, J., de'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L. J., and Reiner, N. E. (2010) An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages, *Journal of cell science* 123, 842-852.
- Silverman, J. M., and Reiner, N. E. (2011) Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes, *Cellular microbiology* 13, 1-9.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., and Baneth, G. (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis, *Veterinary parasitology* 165, 1-18.
- Souza, T. A., Trindade, D. M., Tonoli, C. C., Santos, C. R., Ward, R. J., Arni, R. K., Oliveira, A. H., and Murakami, M. T. (2011) Molecular adaptability of nucleoside diphosphate kinase b from trypanosomatid parasites: stability, oligomerization and structural determinants of nucleotide binding, *Molecular bioSystems* 7, 2189-2195.
- Stebeck, C. E., Beecroft, R. P., Singh, B. N., Jardim, A., Olafson, R. W., Tuckey, C., Prenevost, K. D., and Pearson, T. W. (1995) Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites, *Molecular and biochemical parasitology* 71, 1-13.
- Steen, H., and Mann, M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing, *Nature reviews* 5, 699-711.

- Stegmayer, C., Kehlenbach, A., Tournaviti, S., Wegehingel, S., Zehe, C., Denny, P., Smith, D. F., Schwappach, B., and Nickel, W. (2005) Direct transport across the plasma membrane of mammalian cells of *Leishmania* HASPB as revealed by a CHO export mutant, *Journal of cell science* 118, 517-527.
- Stober, C. B., Lange, U. G., Roberts, M. T., Gilmartin, B., Francis, R., Almeida, R., Peacock, C. S., McCann, S., and Blackwell, J. M. (2006) From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection, *Vaccine* 24, 2602-2616.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C. L., Burshtain, O., Gonen, L., and Baneth, G. (2004) Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs, *The Journal of infectious diseases* 189, 1729-1733.
- Streit, J. A., Recker, T. J., Donelson, J. E., and Wilson, M. E. (2000) BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice, *Experimental parasitology* 94, 33-41.
- Talmi-Frank, D., Strauss-Ayali, D., Jaffe, C. L., and Baneth, G. (2006) Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis, *Clin Vaccine Immunol* 13, 271-276.
- Tjalsma, H., Schaeps, R. M., and Swinkels, D. W. (2008) Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications, *Proteomics Clin Appl* 2, 167-180.
- Vanegas, G., Quinones, W., Carrasco-Lopez, C., Concepcion, J. L., Albericio, F., and Avilan, L. (2007) Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*, *Parasitology research* 101, 1511-1516.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., and et al. (2001) The sequence of the human genome, *Science (New York, N.Y)* 291, 1304-1351.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., and Ouellette, M. (2007) A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death, *Mol Cell Proteomics* 6, 88-101.
- Verlinde, C. L., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Perie, J. J., Fothergill-Gilmore, L. A., Opperdoes, F. R., Gelb, M. H., Hol, W. G., and Michels, P. A. (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs, *Drug Resist Updat* 4, 50-65.
- Volpini, A. C., Passos, V. M., Oliveira, G. C., and Romanha, A. J. (2004) PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis, *Acta tropica* 90, 31-37.
- Werbovetz, K. A., Brendle, J. J., and Sackett, D. L. (1999) Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*, *Molecular and biochemical parasitology* 98, 53-65.

- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L., and Hochstrasser, D. F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *Bio/technology (Nature Publishing Company) 14*, 61-65.
- Williams, J. N., Skipp, P. J., O'Connor, C. D., Christodoulides, M., and Heckels, J. E. (2009a) Immunoproteomic analysis of the development of natural immunity in subjects colonized by *Neisseria meningitidis* reveals potential vaccine candidates, *Infection and immunity 77*, 5080-5089.
- Williams, R. A., Westrop, G. D., and Coombs, G. H. (2009b) Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*, *The Biochemical journal 420*, 451-462.
- Wilson, M. E., Young, B. M., Andersen, K. P., Weinstock, J. V., Metwali, A., Ali, K. M., and Donelson, J. E. (1995) A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice, *Infection and immunity 63*, 2062-2069.
- World Health Organization (2005) Magnitude of the problem. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)>.
- World Health Organization (2010) Control of the Leishmaniasis. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.in/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.in/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)>.
- Xu, D., and Liew, F. Y. (1995) Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*, *Immunology 84*, 173-176.
- York, I. A., Mo, A. X., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C. R., Saric, T., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2003) The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation, *Immunity 18*, 429-440.
- Zhang, W., and Lu, C. P. (2007) Immunoproteomic assay of membrane-associated proteins of *Streptococcus suis* type 2 China vaccine strain HA9801, *Zoonoses and public health 54*, 253-259.
- Zhu, Y. Z., Cai, C. S., Zhang, W., Guo, H. X., Zhang, J. P., Ji, Y. Y., Ma, G. Y., Wu, J. L., Li, Q. T., Lu, C. P., and Guo, X. K. (2010) Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV), *PloS one 5*, e13915.

# Anexos

**Figura Suplementar 1**



**Reatividade do secretoma de *L. infantum* frente ao soro de animais sintomáticos.** Alíquotas da fração secretada, obtida pelo cultivo de *L. infantum* por 6h, foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. Incubação com soros de animais sintomáticos, seguido de detecção por anti-IgG de cão marcado com fosfatase alcalina e revelação por NBT/BCIP.

**Tabela Suplementar 1**

Acesso	emPAI	(M+H) obs	(M+H) esp	(M+H) calc	delta (ppm)	miss	score	expect	U	Sequência de Peptídeo
<i>Citoesqueleto</i>										
LinJ08_V3.1290	8.29	5.087.580	10.155.014	10.155.008	0.61	0	22	0.037		K.SSICDIPPK.G
		5.172.328	10.324.510	10.324.481	2.87	0	33	0.00068		K.NMMQAADPR.H
		5.212.929	10.405.713	10.405.655	5.58	0	49	3.7e-05		R.YLTASALFR.G
		5.252.286	10.484.426	10.484.430	-0.36	0	-29	0.0014		K.NMMQAADPR.H
		5.252.304	10.484.463	10.484.430	3.13	0	-26	0.0022		K.NMMQAADPR.H
		5.332.267	10.644.388	10.644.379	0.87	0	-14	0.039		K.NMMQAADPR.H
		5.392.717	10.765.289	10.765.250	3.59	1	-31	0.0038		K.LREEYPDR.I
		3.598.512	10.765.318	10.765.250	6.24	1	37	0.0011		K.LREEYPDR.I
		5.633.440	11.246.734	11.246.706	2.51	0	60	1.6e-06		K.LAVNLVPFPR.L
		5.737.991	11.455.836	11.455.829	0.59	0	64	2.2e-06		R.FPGQLNSDLR.K
		5.862.845	11.705.544	11.705.492	4.46	0	55	8.3e-06		R.VGEQFTGMFR.R
		5.942.830	11.865.515	11.865.441	6.22	0	-49	2.5e-05		R.VGEQFTGMFR.R
		4.255.643	12.736.711	12.736.779	-5.34	1	32	0.0033		R.FPGQLNSDLR.K.L
		6.643.213	13.266.280	13.266.204	5.73	0	62	2.3e-06	U	R.INVYFDESAGGR.Y
		4.432.234	13.266.483	13.266.503	-1.48	1	-31	0.0038		R.RVGEQFTGMFR.R
		4.485.564	13.426.474	13.426.452	1.60	1	38	0.0006		R.RVGEQFTGMFR.R
		7.238.503	14.456.860	14.456.820	2.76	0	-85	9.8e-09		K.EVDEQMLNVQNK.N
		7.318.464	14.616.782	14.616.769	0.86	0	97	4.8e-10		K.EVDEQMLNVQNK.N
		5.452.709	16.327.908	16.327.851	3.47	0	76	1.2e-07		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		8.174.028	16.327.910	16.327.851	3.59	0	-54	1.6e-05		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		5.466.161	16.368.264	16.368.130	8.18	0	-89	7.2e-09		R.GLSVAELTQQMFDK.N
		8.194.217	16.368.288	16.368.130	9.64	0	120	5.5e-12		R.GLSVAELTQQMFDK.N
		5.506.031	16.487.874	16.487.800	4.48	0	-66	1.2e-06		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		8.254.010	16.487.875	16.487.800	4.49	0	-57	9.3e-06		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		5.519.435	16.528.086	16.528.080	0.39	0	-66	1.6e-06		R.GLSVAELTQQMFDK.N

							1,00E-		
		8.274.116	16.528.087	16.528.080	0.44	0	-97	09	R.GLSVAELTQQMFDK.N
		8.333.973	16.647.800	16.647.750	3.03	0	-23	0.016	R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		8.629.406	17.238.667	17.238.569	5.65	0	89	5.9e-09	K.NSSYFIEWIPNNIK.S
		5.756.295	17.238.667	17.238.569	5.68	0	-50	4.8e-05	K.NSSYFIEWIPNNIK.S
							7,00E-		
		6.786.616	20.329.630	20.329.524	5.23	0	97	10	K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K
		10.244.766	20.469.386	20.469.325	2.95	0	76	5.3e-08	K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		6.833.202	20.469.387	20.469.325	3.03	0	-73	1.3e-07	K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		6.886.510	20.629.312	20.629.275	1.80	0	-22	0.012	K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		10.324.729	20.629.312	20.629.275	1.84	0	-65	5.8e-07	K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		7.213.603	21.610.590	21.610.474	5.41	1	60	5.5e-06	K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K
		10.998.480	32.965.222	32.965.112	3.35	0	111	2.1e-11	K.EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISK.L
		8.251.379	32.965.224	32.965.112	3.40	0	-55	8.7e-06	K.EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISK.L
		11.455.217	45.780.578	45.780.513	1.43	0	49	1.7e-05	R.VSDTVVEPYNTTSLVHQLVENSDESMCIDNEALYD
LinJ08_V3.1280	8.24	5.087.580	10.155.014	10.155.008	0.61	0	22	0.037	K.SSICDIPPK.G
		5.172.328	10.324.510	10.324.481	2.87	0	33	0.00068	K.NMMQAADPR.H
		5.212.929	10.405.713	10.405.655	5.58	0	49	3.7e-05	R.YLTASALFR.G
		5.252.286	10.484.426	10.484.430	-0.36	0	-29	0.0014	K.NMMQAADPR.H
		5.252.304	10.484.463	10.484.430	3.13	0	-26	0.0022	K.NMMQAADPR.H
		5.332.267	10.644.388	10.644.379	0.87	0	-14	0.039	K.NMMQAADPR.H
		5.392.717	10.765.289	10.765.250	3.59	1	-31	0.0038	K.LREEYPDR.I
		3.598.512	10.765.318	10.765.250	6.24	1	37	0.0011	K.LREEYPDR.I
		5.633.440	11.246.734	11.246.706	2.51	0	60	1.6e-06	K.LAVNLVPFPR.L
		5.737.991	11.455.836	11.455.829	0.59	0	64	2.2e-06	R.FPGQLNSDLR.K
		5.862.845	11.705.544	11.705.492	4.46	0	55	8.3e-06	R.VGEQFTGMFR.R
		5.942.830	11.865.515	11.865.441	6.22	0	-49	2.5e-05	R.VGEQFTGMFR.R
		4.255.643	12.736.711	12.736.779	-5.34	1	32	0.0033	R.FPGQLNSDLR.K.L
		4.432.234	13.266.483	13.266.503	-1.48	1	-31	0.0038	R.RVGEQFTGMFR.R

		4.485.564	13.426.474	13.426.452	1.60	1	38	0.0006		R.RVGEQFTGMFR.R
		6.793.269	13.566.393	13.566.310	6.09	0	64	1.1e-06	U	R.INVYFDESTGGR.Y
		7.238.503	14.456.860	14.456.820	2.76	0	-85	9.8e-09		K.EVDEQMLNVQNK.N
		7.318.464	14.616.782	14.616.769	0.86	0	97	4.8e-10		K.EVDEQMLNVQNK.N
		5.452.709	16.327.908	16.327.851	3.47	0	76	1.2e-07		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		8.174.028	16.327.910	16.327.851	3.59	0	-54	1.6e-05		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		5.466.161	16.368.264	16.368.130	8.18	0	-89	7.2e-09		R.GLSVAELTQQMFDK.N
		8.194.217	16.368.288	16.368.130	9.64	0	120	5.5e-12		R.GLSVAELTQQMFDK.N
		5.506.031	16.487.874	16.487.800	4.48	0	-66	1.2e-06		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		8.254.010	16.487.875	16.487.800	4.49	0	-57	9.3e-06		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		5.519.435	16.528.086	16.528.080	0.39	0	-66	1.6e-06		R.GLSVAELTQQMFDK.N
								1,00E-		
		8.274.116	16.528.087	16.528.080	0.44	0	-97	09		R.GLSVAELTQQMFDK.N
		8.333.973	16.647.800	16.647.750	3.03	0	-23	0.016		R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
		8.629.406	17.238.667	17.238.569	5.65	0	89	5.9e-09		K.NSSYFIEWIPNNIK.S
		5.756.295	17.238.667	17.238.569	5.68	0	-50	4.8e-05		K.NSSYFIEWIPNNIK.S
								7,00E-		
		6.786.616	20.329.630	20.329.524	5.23	0	97	10		K.GHYTEGAELIDSVLVCR.K
		10.244.766	20.469.386	20.469.325	2.95	0	76	5.3e-08		K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		6.833.202	20.469.387	20.469.325	3.03	0	-73	1.3e-07		K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		6.886.510	20.629.312	20.629.275	1.80	0	-22	0.012		K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		10.324.729	20.629.312	20.629.275	1.84	0	-65	5.8e-07		K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R
		7.213.603	21.610.590	21.610.474	5.41	1	60	5.5e-06		K.GHYTEGAELIDSVLVCRK.E
		10.998.480	32.965.222	32.965.112	3.35	0	111	2.1e-11		K.EAESCDCLOQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISK.L
		8.251.379	32.965.224	32.965.112	3.40	0	-55	8.7e-06		K.EAESCDCLOQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISK.L
		11.455.217	45.780.578	45.780.513	1.43	0	49	1.7e-05		R.VSDTVVEPYNTTSLVHQLVENSDESMCIDNEALYD
LinJ13_V3.0330	5.05	3.912.113	7.804.081	7.804.018	8.06	0	47	5.1e-05	U	R.LSVDYGK.K
		4.522.187	9.024.228	9.024.208	2.27	0	26	0.0082	U	K.FDLMYSK.R
		3.038.410	9.085.012	9.084.967	4.91	1	-41	0.00023	U	R.LSVDYGKK.S



4.552.579	9.085.013	9.084.967	4.99	1	58	4.8e-06	U	R.LSVDYGKK.S		
4.602.190	9.184.234	9.184.157	8.43	0	-24	0.013	U	K.FDLMYSK.R		
5.082.952	10.145.758	10.145.709	4.83	0	51	4.4e-05	U	K.DVNAAIATIK.T		
5.122.290	10.224.435	10.224.417	1.72	0	54	7.5e-06	U	K.EDAANNYAR.G		
5.222.933	10.425.720	10.425.659	5.89	0	53	3.6e-05	U	K.EIVDLALDR.I		
6.422.567	12.824.989	12.824.967	1.72	0	54	4.4e-06	U	K.YMSCCLMYR.G		
6.502.549	12.984.952	12.984.916	2.79	0	-26	0.0024	U	K.YMSCCLMYR.G		
6.803.689	13.587.232	13.587.194	2.82	0	80	4.6e-08	U	R.QLFNPEQLVSGK.E		
5.335.964	15.977.673	15.977.599	4.61	0	-39	0.00049	U	R.TIQFVDWCPTGFK.C		
7.998.943	15.977.740	15.977.599	8.82	0	69	4.8e-07	U	R.TIQFVDWCPTGFK.C		
5.552.893	16.628.461	16.628.325	8.16	0	46	0.00016	U	R.SLDIERPSYTNVNR.L		
5.876.604	17.599.594	17.599.509	4.83	0	90	3.6e-09	U	R.IHFVLTSYAPVVSAEK.A		
6.023.142	18.039.208	18.039.077	7.26	0	-76	1.1e-07	U	R.CIFLDLEPTVVDEVR.T		
9.029.677	18.039.209	18.039.077	7.30	0	107	9.6e-11	U	R.CIFLDLEPTVVDEVR.T		
6.086.442	18.229.108	18.229.070	2.14	0	-90	4.6e-09	U	R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I		
9.124.650	18.229.155	18.229.070	4.69	0	-86	1.1e-08	U	R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I		
6.139.756	18.389.049	18.389.019	1.66	0	-85	1.3e-08	U	R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I		
9.204.598	18.389.050	18.389.019	1.70	0	110	4.6e-11	U	R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I		
9.434.811	18.849.476	18.849.404	3.82	0	73	3,00E-07	U	K.CGINYQPPTVVPGGDLAK.V		
6.293.232	18.849.477	18.849.404	3.88	0	-71	4.4e-07	U	K.CGINYQPPTVVPGGDLAK.V		
7.773.462	23.290.167	23.290.110	2.48	0	115	4.3e-12	U	R.AFVHWYVGEGMEEGEFSEAR.E		
7.826.796	23.450.170	23.450.059	4.76	0	-74	5.2e-08	U	R.AFVHWYVGEGMEEGEFSEAR.E		
7.887.254	23.631.544	23.631.505	1.62	1	83	2.2e-08	U	R.QLFNPEQLVSGKEDAANNYAR.G		
8.037.470	24.082.192	24.082.012	7.46	0	-145	1.5e-14	U	R.FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR.I		
12.051.169	24.082.193	24.082.012	7.52	0	148	7.5e-15	U	R.FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR.I		
8.744.390	26.202.953	26.202.843	4.18	0	-92	3.2e-09	U	K.AYHEQLSVADITNSVFEPAGMLTK.C		
8.797.704	26.362.893	26.362.792	3.84	0	95	1.4e-09	U	K.AYHEQLSVADITNSVFEPAGMLTK.C		
LinJ29_V3.1880	0.48	3.647.496	7.274.847	7.274.843	0.43	0	16	0.027	U	R.LIELLK.D

		3.872.119	7.724.093	7.724.079	1.78	0	31	0.005	U	K.IQDLER.Q
		3.877.047	7.733.949	7.733.919	3.83	0	29	0.0044		R.LEEIDR.N
								3,00E-		
		4.062.110	12.156.112	12.156.095	1.38	1	52	05	U	K.ADLEDAEAVKR.Y
		6.773.333	13.526.521	13.526.434	6.39	0	28	0.007	U	K.WNLMEAYDLAK.L
		7.644.107	15.268.069	15.268.053	1.04	0	99	4.9e-10	U	R.SQLDATQLAQVPTR.T
		5.122.901	15.338.485	15.338.403	5.36	0	-31	0.0026	U	R.VVSFTQLIDNSIAK.M
		7.679.315	15.338.485	15.338.403	5.37	0	91	2.7e-09	U	R.VVSFTQLIDNSIAK.M
		5.452.888	21.771.262	21.771.190	3.27	0	23	0.023	U	R.ELYRPEDKPKQFMDIIGVK.K
LinJ16_V31510	0.14	3.877.047	7.733.949	7.733.919	3.83	0	29	0.0044		R.LEEIDR.Q
		5.092.650	10.165.155	10.165.138	1.64	0	64	2.2e-06	U	K.TGEELAELR.L
		6.443.326	12.866.506	12.866.466	3.11	0	47	8.3e-05	U	K.SEQLIAENVER.Q
LinJ04_V3.1250	0.07	7.603.971	30.375.593	30.375.509	2.75	0	62	2.8e-06	U	R.TTGIVLDAGDGVTHTVPIYEGYSLPHAVR.R

*Resposta ao choque térmico*

LinJ28_V3.2960	2.16	4.652.576	9.285.006	9.284.978	3.08	0	52	3.9e-05	U	R.STIQPVER.V
		3.305.140	9.885.202	9.885.189	1.32	1	41	0.00049	U	R.LSKDEIER.M
		5.237.766	10.455.387	10.455.404	-1.63	0	50	7.1e-05	U	R.NQITITNDK.G
		5.462.700	10.905.255	10.905.255	0.02	0	50	4.2e-05	U	K.NTLGDSNVSGK.L
		6.078.136	12.136.126	12.136.051	6.22	0	72	2.7e-07	U	R.VDIIANDQGNR.T
		6.078.440	12.136.734	12.136.666	5.60	0	80	5.8e-08	U	K.DAGTIAGLEVLR.I
		4.072.108	12.186.105	12.186.092	1.11	1	36	0.0016	U	K.LDDSDKATLNK.E
		4.205.630	12.586.671	12.586.629	3.33	1	37	0.0011	U	R.NQITITNDKGR.L
		6.308.312	12.596.478	12.596.438	3.18	0	75	2.8e-07	U	R.LVTFEETFEFK.R
		6.423.362	12.826.578	12.826.558	1.59	0	82	2.5e-08	U	K.VQSLVSDFFGGK.E
		6.433.013	12.845.880	12.845.809	5.54	0	51	1.7e-05	U	R.FEELCGDLFR.S
		4.425.799	13.247.179	13.247.099	5.97	0	39	0.0005	U	R.SVHDVVLVGGSTR.I
		4.649.033	13.916.880	13.916.867	0.95	0	-25	0.018	U	K.GDDKPMIAVQYR.G
		4.702.389	14.076.948	14.076.816	9.38	0	38	0.00059	U	K.GDDKPMIAVQYR.G
		4.729.232	14.157.477	14.157.449	2.00	1	53	2.7e-05	U	R.LVTFEETFEFKR.K

		7.373.495	14.726.844	14.726.783	4.13	0	76	7,00E-08	U	R.TTPSYVAFTDSER.L
		5.049.163	15.117.270	15.117.191	5.26	1	52	2.9e-05	U	R.ARFEELCGDLFR.S
		7.839.013	15.657.881	15.657.838	2.71	0	67	9.6e-07	U	K.AVVTVPAYFNDSQR.Q
		5.252.280	15.726.623	15.726.548	4.73	1	-29	0.0012	U	R.MVNDAMKYEADDR.A
		5.305.578	15.886.516	15.886.497	1.16	1	62	7,00E-07	U	R.MVNDAMKYEADDR.A
		7.979.235	15.938.325	15.938.324	0.07	0	49	4.7e-05	U	K.TFTPEEISSMVLLK.M
		8.304.525	16.588.905	16.588.879	1.56	0	92	3.3e-09	U	R.IINEPTAAAIAYGLDK.G
		5.539.708	16.588.906	16.588.879	1.66	0	-43	0.0002	U	R.IINEPTAAAIAYGLDK.G
		6.560.028	19.649.866	19.649.778	4.45	0	75	1.4e-07	U	K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G
		6.050.639	24.162.265	24.162.234	1.30	2	97	1.2e-09	U	R.IINEPTAAAIAYGLDKGDDGKER.N
		8.747.596	26.212.569	26.212.510	2.24	0	68	6.3e-07	U	K.SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGER.A
		9.898.961	29.666.665	29.666.614	1.74	0	105	3.3e-11	U	K.QTEGLLLLLDVTPLTLGIETAGGVMTALIK.R
LinJ33_V3.0360	0.69	3.392.039	6.763.932	6.763.908	3.59	0	20	0.022	U	K.EIFLR.E
		3.877.324	7.734.502	7.734.469	4.29	0	28	0.0071	U	K.LMELLR.F
		3.758.617	11.245.633	11.245.574	5.19	0	36	0.00088	U	K.LGIHEDTANR.K
		5.737.882	11.455.619	11.455.604	1.24	0	42	0.00026	U	K.SIYYITGDSK.K
		6.288.535	12.556.925	12.556.884	3.22	0	61	3.8e-06	U	K.ADLVNNLGTIAR.S
		6.617.989	13.215.832	13.215.820	0.95	0	68	2.2e-07	U	R.ELISNASDACDK.I
		4.502.275	13.476.607	13.476.572	2.63	0	30	0.0048	U	K.HFSVEGQLEFR.S
		7.573.998	15.127.850	15.127.784	4.38	0	85	1.3e-08	U	K.GVVVSEDLPLNISR.E
		8.249.138	16.478.131	16.478.104	1.62	0	101	4.3e-10	U	R.YQSLTDPSVLGESPR.L
		5.502.783	16.478.131	16.478.104	1.65	0	-44	0.00019	U	R.YQSLTDPSVLGESPR.L
		5.000.240	19.960.668	19.960.629	1.98	1	41	0.00034	U	R.ITLHLKEDQLEYLEPR.R
		7.866.946	23.570.619	23.570.531	3.75	0	-57	4.1e-06	U	R.VFIMDNCELDLCPDWLGFVK.G
		11.795.383	23.570.621	23.570.531	3.83	0	85	6.3e-09	U	R.VFIMDNCELDLCPDWLGFVK.G
		7.920.247	23.730.523	23.730.480	1.83	0	-42	9.1e-05	U	R.VFIMDNCELDLCPDWLGFVK.G
LinJ30_V3.2470	0.36	3.727.192	7.434.239	7.434.177	8.24	0	37	0.0021	U	R.ELVEVR.N
		4.012.469	8.004.792	8.004.756	4.54	0	48	8.2e-05	U	K.TLVAELR.K

		6.003.412	11.986.678	11.986.670	0.70	0	30	0.0047	U	K.DAGTIAGLNVIR.V
		4.278.815	12.806.227	12.806.248	-1.67	1	53	1.9e-05	U	K.YVSDAEKENVK.T
		6.743.293	13.466.440	13.466.426	1.06	0	71	3.5e-07	U	R.NNAETQLTTAER.Q
		9.405.186	18.790.227	18.790.163	3.38	0	-63	1.5e-06	U	R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G
		6.273.482	18.790.228	18.790.163	3.44	0	85	9.8e-09	U	R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G
LinJ18_V3.1350	0.33	4.452.319	8.884.493	8.884.487	0.61	0	40	0.00069	U	R.LLQACER.L
		4.472.275	8.924.405	8.924.403	0.21	0	29	0.0067	U	R.GFAEAGVSR.D
		4.577.711	9.135.276	9.135.233	4.77	0	42	0.00045	U	R.LVEEVLGR.G
		5.908.068	11.795.991	11.795.958	2.80	0	26	0.013	U	K.FLTCNIIGDK.C
		6.623.136	13.226.126	13.226.102	1.82	0	73	1.5e-07	U	R.SYVNEAATTDPR.V
		5.512.866	16.508.380	16.508.365	0.91	0	57	1.1e-05	U	K.NELESYILDFRPR.L
		5.779.532	17.308.377	17.308.331	2.66	0	33	0.0025	U	R.ATMESLCQDVLHSIK.S
		6.479.648	19.408.725	19.408.648	3.97	0	34	0.00065	U	R.DCDYLLYEHLNEVK.S
								6,00E-		
		7.183.619	21.520.638	21.520.623	0.72	0	59	06	U	R.LSSGGMLIEYAAPDAAANFVR.Q
LinJ27_V3.2350	0.07	6.630.070	19.859.992	19.859.921	3.60	0	23	0.026	U	K.DIVHELPPLEAFYCGK.T
LinJ08_V3.1020	0.05	7.104.011	14.187.877	14.187.843	2.39	0	35	0.0012	U	K.LSLLMLQPDYVK.M
LinJ26_V3.1220	0.04	7.063.116	14.106.086	14.106.124	-2.66	0	23	0.0047	U	K.TQTYSNADNQR.N
LinJ33_V3.2520	0.04	7.570.689	22.681.849	22.681.824	1.11	1	19	0.05	U	R.QLLDIVACSLYSDKEVFIR.E
<i>Síntese protéica</i>										
LinJ01_V3.0790	1.08	3.841.980	7.663.814	7.663.796	2.42	0	28	0.0033	U	R.VMNTFR.S
		3.882.276	7.744.406	7.744.388	2.37	0	48	7.6e-05	U	R.AIAPFTR.G
		4.952.820	9.885.495	9.885.441	5.48	0	50	4.1e-05	U	R.ESLTLEGIK.Q
		5.412.805	10.805.465	10.805.451	1.26	0	20	0.045	U	R.IGEFLSNSSK.F
		5.438.309	10.856.472	10.856.445	2.51	0	64	1.1e-06	U	R.VLVTTDLVAR.G
								1,00E-		
		5.818.356	11.616.566	11.616.506	5.15	0	84	08	U	K.TGAFSIGLLQR.L
		5.872.726	11.725.306	11.725.285	1.83	0	48	1.9e-05	U	K.FCETFVGGTR.V
		6.518.371	13.016.596	13.016.575	1.61	0	48	8.9e-05	U	R.GGDIIAQAQSGTGK.T
		6.653.726	13.287.307	13.287.299	0.56	0	81	4.7e-08	U	R.ELALQTAEVISR.I

		4.832.863	14.468.370	14.468.307	4.38	0	68	1.9e-07	U	R.HNLIQGLVLSPTR.E
		7.880.922	23.612.548	23.612.501	2.00	1	41	0.00026	U	K.DIQVALFSATMPPEEVLELTKK.F
LinJ36_V3.0190	1.03	3.972.062	7.923.979	7.923.986	-0.94	0	20	0.036	U	R.SVLMMGR.Y
		4.537.566	9.054.986	9.054.971	1.73	0	41	0.00028	U	K.YSVSPVVR.V
		4.662.216	9.304.286	9.304.269	1.84	0	21	0.011	U	R.FANMYAAK.F
		4.852.770	9.685.395	9.685.403	-0.89	0	31	0.0025	U	R.GGGQIPTAR.R
		5.142.930	10.265.715	10.265.710	0.51	0	52	1.2e-05	U	R.GPNVVVDVTK.G
		5.172.892	10.325.638	10.325.604	3.32	0	59	6.4e-06	U	K.ISEPVSFR.E
		5.392.898	10.765.650	10.765.615	3.31	0	37	0.0013	U	M.VNFTVDQVR.E
		6.067.902	12.115.659	12.115.611	3.93	0	63	1.6e-06	U	R.LWGDNFFDAK.N
		6.197.613	12.375.080	12.375.067	1.07	0	46	2.6e-05	U	R.EGVLCDENMR.G
		6.403.048	12.785.951	12.785.914	2.86	0	47	7.3e-05	U	R.ELMDYPDQIR.N
		7.164.094	14.308.043	14.307.981	4.37	0	77	5.9e-08	U	K.STLSDSLPGAAGI.K
		7.228.411	14.436.677	14.436.639	2.63	0	72	1.9e-07	U	R.VFYACCLTASPR.L
		7.913.753	15.807.361	15.807.352	0.53	0	63	1.8e-06	U	R.ETVTDVSSQQCLSK.S
		7.968.957	15.917.768	15.917.738	1.90	0	26	0.011	U	K.NCDPAAPMLYISK.M
		5.325.950	15.947.631	15.947.587	2.74	0	82	2.2e-08	U	K.SATITDDGESPHPLR.D
		8.784.048	17.547.950	17.547.900	2.86	0	79	2.5e-08	U	R.FLADNYEWDVQEAR.K
		8.789.526	17.558.906	17.558.832	4.23	0	-84	2.2e-08	U	R.AYLPVAESFGFTADLR.A
		5.863.042	17.558.908	17.558.832	4.32	0	101	4.6e-10	U	R.AYLPVAESFGFTADLR.A
		10.320.403	20.620.660	20.620.622	1.83	0	100	4.8e-10	U	R.AILELQLDPEEAYQGFVK.T
		6.883.627	20.620.662	20.620.622	1.91	0	-80	5.5e-08	U	R.AILELQLDPEEAYQGFVK.T
		7.997.255	23.961.547	23.961.417	5.45	0	57	9.1e-06	U	R.GAPLTEELALAMEEGTAGPEADPK.V
		8.734.433	26.173.081	26.173.092	-0.43	0	74	2.3e-07	U	R.VTDGALVVVDCVEGVCVQTETVLR.Q
LinJ34_V3.0870	0.58	4.617.664	9.215.182	9.215.171	1.20	0	30	0.0018	U	K.SSILFDIK.A
		4.652.949	9.285.752	9.285.746	0.68	0	37	0.00041	U	K.LVPVAFGVK.K
		3.475.118	10.395.136	10.395.087	4.72	0	20	0.043	U	R.DGLIWGDHK.L
		7.948.968	15.877.790	15.877.780	0.63	0	97	1.1e-09	U	K.AWDDTIDLEALAQL.L
LinJ17_V3.0090	0.44	4.037.072	8.053.999	8.053.970	3.57	0	19	0.046	U	R.VGYNPEK.V

		4.477.410	8.934.674	8.934.647	3.08	0	27	0.0086	U	K.YAWVLDK.L
		4.647.955	9.275.765	9.275.753	1.22	0	19	0.02	U	R.QTVAVGIIK.G
		4.382.409	13.117.009	13.116.935	5.60	0	59	4.4e-06	U	K.SVFTIIDAPGHR.D
		8.819.366	17.618.586	17.618.508	4.42	0	-39	0.0005	U	R.FIPISGWQGDNMIER.S
		8.899.318	17.778.491	17.778.457	1.88	0	48	7.5e-05	U	R.FIPISGWQGDNMIER.S
LinJ23_V3.0220	0.41	6.158.492	12.296.838	12.296.802	2.96	0	36	0.0011	U	K.SCAVQLIAQIK.A
		8.174.095	16.328.044	16.328.029	0.94	0	106	1.3e-10	U	K.LMVGQLGDSLTAEDGK.A
LinJ36_V3.0990	0.17	4.942.773	9.865.401	9.865.396	0.44	0	32	0.0031	U	R.LLNTNVEGK.R
LinJ07_V3.0760	0.14	4.349.241	13.017.505	13.017.455	3.79	0	74	8.6e-08	U	R.LLLTLPENHPR.R
LinJ27_V3.1230	0.12	4.522.585	9.025.025	9.025.007	1.91	0	19	0.046	U	K.SLALCALR.F
		5.022.831	10.025.517	10.025.532	-1.52	0	20	0.053	U	R.LCLVELTR.I
		5.317.950	10.615.754	10.615.717	3.53	0	24	0.017	U	R.STIIGESISR.L
LinJ09_V3.1020	0.12	4.112.303	8.204.460	8.204.443	2.09	0	26	0.0099	U	R.TFLVGER.M
		4.019.016	12.026.830	12.026.771	4.89	0	53	1.3e-05	U	K.LLAPLHPESAR.A
LinJ13_V3.1120	0.10	6.133.716	12.247.286	12.247.264	1.81	0	30	0.0012	U	R.ECLPLLVIIR.N
LinJ07_V3.0550	0.08	7.274.252	14.528.358	14.528.300	3.96	0	54	6.8e-06	U	R.APLAVVTGLQEVTR.A

#### *Metabolismo de carbohidratos*

LinJ14_V3.1240	4.40	3.787.419	7.554.693	7.554.653	5.20	0	40	0.00047	U	K.LNQLLR.I
		3.882.291	7.744.436	7.744.388	6.23	0	48	7.5e-05	U	K.AGVPLYR.Y
		4.472.607	8.925.069	8.925.018	5.68	0	63	1.1e-06	U	R.YIAGLAGTK.D
		5.032.736	10.045.326	10.045.324	0.19	0	25	0.014	U	K.SACNSLLK.I
		3.788.594	11.335.564	11.335.539	2.19	0	-20	0.049	U	R.MGSEVYHALK.V
		3.841.916	11.495.529	11.495.488	3.58	0	23	0.026	U	R.MGSEVYHALK.V
		6.077.690	12.135.234	12.135.220	1.17	0	54	4.3e-06	U	R.YCGAGCTQAVK.N
		7.078.815	14.137.484	14.137.439	3.20	0	71	4.3e-07	U	R.LPVPCFNVINGGK.H
		7.584.240	15.148.335	15.148.304	2.04	0	81	3.8e-08	U	K.INQIGTISESIAAAK.L
		5.059.518	15.148.336	15.148.304	2.13	0	-62	2.7e-06	U	K.INQIGTISESIAAAK.L
		8.154.298	16.288.451	16.288.370	4.97	0	112	3,00E-11	U	K.AQIVGDDLTVTNVER.V

		5.439.557	16.288.452	16.288.370	5.07	0	-68	7.9e-07	U	K.AQIVGDDLTVTNVER.V
		5.833.168	17.469.285	17.469.226	3.39	0	68	6.4e-07	U	K.HIDEPLPILMEAIEK.A
		5.886.457	17.629.152	17.629.175	-1.27	0	-61	3.7e-06	U	K.HIDEPLPILMEAIEK.A
		6.099.630	18.268.672	18.268.581	4.98	0	61	3.3e-06	U	R.SAVPSGASTGVHEACELR.D
		6.169.796	18.479.170	18.479.088	4.47	0	-51	4.1e-05	U	R.GNPTVEVELMTEAGVFR.S
		9.249.670	18.479.194	18.479.088	5.77	0	78	7.6e-08	U	R.GNPTVEVELMTEAGVFR.S
		6.340.004	18.989.795	18.989.713	4.30	0	-56	1.1e-05	U	K.HAGNVLPFQEFMIAPTK.A
		6.393.318	19.149.735	19.149.662	3.83	0	56	9.5e-06	U	K.HAGNVLPFQEFMIAPTK.A
		9.674.739	19.329.332	19.329.218	5.92	0	95	1.3e-09	U	K.YGQDAVNVGDEGGFAPPIK.H
		6.453.184	19.329.334	19.329.218	6.03	0	-58	5.9e-06	U	K.YGQDAVNVGDEGGFAPPIK.H
		6.803.309	20.379.708	20.379.643	3.18	0	-88	6.1e-09	U	K.NPEPTYVSAELQATYER.W
		10.199.927	20.379.708	20.379.643	3.18	0	115	1.3e-11	U	K.NPEPTYVSAELQATYER.W
								1,00E-		
		7.520.372	22.530.897	22.531.012	-5.13	0	-96	09	U	R.SGETEDTYIADLSVGLGTGQIK.T
		11.275.521	22.530.897	22.531.012	-5.12	0	144	1.5e-14	U	R.SGETEDTYIADLSVGLGTGQIK.T
		7.994.176	23.952.310	23.952.231	3.31	1	74	1.7e-07	U	K.NVNEILAPALVGKDESDQAGLDK.M
LinJ27_V3.1710	0.77	4.772.308	9.524.471	9.524.436	3.59	0	41	0.00024	U	R.AMDFLNSR.D
		5.047.946	10.075.746	10.075.764	-1.74	0	27	0.0033	U	R.VPAQLLDPR.K
		5.412.904	10.805.663	10.805.638	2.32	0	35	0.0012	U	R.GALCVLSYAK.T
		6.538.496	13.056.847	13.056.830	1.30	0	29	0.0062	U	R.VWLLNTGYAGGR.A
		6.548.216	13.076.286	13.076.258	2.15	0	50	3.3e-05	U	R.HATYYGEQLAR.K
		7.419.215	14.818.285	14.818.242	2.89	0	54	1.1e-05	U	R.NLTAPELVQWALK.L
								3,00E-		
		5.295.806	15.857.201	15.857.195	0.35	0	49	05	U	R.MLIGDDEHVWTDR.G
		5.349.125	16.017.156	16.017.144	0.74	0	-46	4.7e-05	U	R.MLIGDDEHVWTDR.G
		4.584.633	18.298.240	18.298.155	4.65	0	-39	0.00031	U	R.DHLFIVDCFAGHDER.Y
		6.109.487	18.298.244	18.298.155	4.82	0	54	9.2e-06	U	R.DHLFIVDCFAGHDER.Y
		7.066.765	21.170.077	21.170.025	2.44	1	57	6.8e-06	U	R.VADTDDVRENVDWGSVNVK.L
LinJ36_V3.6960	0.64	4.152.287	8.284.428	8.284.454	-3.03	0	21	0.027	U	K.AQVLGDAR.H
		6.162.848	12.305.550	12.305.517	2.73	0	45	3.7e-05	U	K.SGEIYTGEGYR.Y

		6.253.387	12.486.628	12.486.601	2.14	0	57	1,00E-05	U	R.FTEELEAVLAK.V
		6.677.903	13.335.660	13.335.681	-1.55	0	60	1,00E-06	U	R.QDGCDAAIASGGGR.M
		6.733.643	13.447.141	13.447.136	0.36	0	77	1,00E-07	U	K.SAEITEAAIEALK.S
		7.003.954	13.987.762	13.987.718	3.13	0	82	2.2e-08	U	R.VALQGASLVDDALK.S
		5.012.612	15.007.618	15.007.572	3.04	0	64	1.9e-06	U	R.DNQIYSIIIEHAAK.N
		5.305.882	15.887.428	15.887.376	3.24	1	30	0.0043	U	K.VRQDGCDAAIASGGGR.M
		4.877.633	19.470.241	19.470.174	3.45	0	77	7.9e-08	U	K.EGSTLHLIGLLSDGGVHRS.D
		6.735.708	26.902.541	26.902.467	2.75	0	29	0.004	U	R.AHGTAVGLPTDADMGNSEVGHNALGAGR.V
LinJ16_V30760	0.63	4.332.339	8.644.532	8.644.494	4.45	0	20	0.045	U	R.ILDWYR.K
		5.282.461	10.544.776	10.544.753	2.20	0	36	0.00085	U	R.MYEEAGISR.N
		6.518.454	13.016.762	13.016.728	2.67	0	30	0.0047	U	K.LASTWEGIQAAR.T
		7.453.636	14.887.126	14.887.130	-0.24	0	34	0.0017	U	R.NVEEILELAGCDK.L
		10.495.778	20.971.410	20.971.317	4.41	0	140	3.5e-14	U	K.LTISPSLLEELAASEGNVVR.K
		7.000.543	20.971.411	20.971.317	4.49	0	-77	5.9e-08	U	K.LTISPSLLEELAASEGNVVR.K
LinJ25_V3.1210	0.62	6.173.509	12.326.872	12.326.839	2.73	0	35	0.0011	U	K.VIDLILPYCK.G
		7.294.260	14.568.375	14.568.323	3.56	0	60	2.6e-06	U	K.TVIIMELINNVAK.G
		7.438.731	14.857.317	14.857.286	2.08	0	70	5.2e-07	U	R.VAQSALTMAEYFR.D
		7.468.939	14.917.733	14.917.681	3.45	0	95	1.8e-09	U	R.FTQANSEVSALLGR.I
		4.982.651	14.917.735	14.917.681	3.58	0	-33	0.0024	U	R.FTQANSEVSALLGR.I
		8.304.472	16.588.799	16.588.727	4.34	0	84	2.2e-08	U	K.LADQAAEDTILTTGIK.V
		6.313.384	18.909.933	18.909.840	4.94	0	33	0.0023	U	R.DVEGQNVLLFIDNIFR.F
		9.465.040	18.909.935	18.909.840	5.05	0	-24	0.021	U	R.DVEGQNVLLFIDNIFR.F
		7.580.608	22.711.605	22.711.569	1.61	0	82	3.7e-08	U	R.IPAAVGYQPTLAEDLGMLQER.I
LinJ36_V3.1320	0.55	4.432.618	8.845.091	8.845.080	1.26	0	49	3.2e-05	U	R.EVVAALQR.H
		3.048.285	9.114.636	9.114.613	2.52	0	29	0.0032	U	R.VSEHVWR.E
		4.612.454	9.204.762	9.204.716	5.08	0	29	0.0066	U	R.FNAETLAR.Y
		7.113.514	14.206.882	14.206.868	1.00	0	88	8,00E-	U	K.GLLAADESIGSCTK.R



		5.313.039	15.908.899	15.908.868	1.89	1	62	1.1e-06	U	R.LKTPYESELIATVK.K
		9.698.226	29.064.459	29.064.371	3.01	0	34	0.0018	U	R.ALMLEAEGFEQYISGVILHEETVGQK.A
LinJ36_V3.2070	0.53	4.282.238	8.544.330	8.544.287	5.09	0	38	0.00047	U	R.GTFVEFR.N
		8.284.741	16.549.337	16.549.294	2.58	0	-69	6.9e-07	U	K.VILLFDVDGTLTPPR.N
		5.526.519	16.549.339	16.549.294	2.72	0	95	1.7e-09	U	K.VILLFDVDGTLTPPR.N
		5.549.720	16.618.941	16.618.923	1.10	0	52	2.9e-05	U	K.CLHLIADLDIPVQR.G
LinJ23_V3.0410	0.36	5.122.829	10.225.512	10.225.470	4.11	0	44	0.0001	U	R.FVIDMASLK.R
		4.182.292	12.516.657	12.516.612	3.65	1	19	0.055	U	K.SKLEPFTFQR.R
		7.488.575	14.957.004	14.956.976	1.85	0	32	0.002	U	K.ISIECINEAYER.M
		5.122.617	15.337.633	15.337.576	3.72	0	79	6.6e-08	U	K.TPTFGGYSDHVVR.E
LinJ35_V3.0030	0.35	4.877.496	9.734.847	9.734.829	1.84	0	41	0.00044	U	R.SAEQVGEVR.E
		5.643.030	11.265.914	11.265.870	3.92	0	32	0.0021	U	R.GDLGVEIPAEC.V
		3.801.656	15.166.332	15.166.266	4.39	0	16	0.025	U	R.MNFSHGSHEYHR.T
		6.423.279	19.239.618	19.239.578	2.08	0	-23	0.027	U	R.QLNITQGVESVFFDAEK.L
		9.629.883	19.239.620	19.239.578	2.18	0	60	5.4e-06	U	R.QLNITQGVESVFFDAEK.L
LinJ05_V3.0500	0.34	3.336.827	6.653.509	6.653.497	1.82	0	23	0.021	U	R.SYGALR.Y
		4.112.291	8.204.436	8.204.443	-0.78	0	31	0.0033	U	K.GILAEYR.K
		4.217.782	8.415.418	8.415.385	3.96	0	54	1.2e-05	U	R.QISLLLR.R
		5.462.825	10.905.504	10.905.441	5.78	0	21	0.038	U	R.VGSSAQNVAMK.A
		5.185.867	15.527.382	15.527.310	4.60	0	59	3.7e-06	U	R.EAYPGDVFYLHSR.L
		6.203.373	18.579.900	18.579.870	1.63	0	42	0.00027	U	R.IGIILMDNITEVQSGQK.V
LinJ25_V3.2090	0.34	5.888.166	11.756.186	11.756.186	0.00	0	60	6.4e-06	U	K.GLLGYVPESNK.N
		7.273.310	14.526.474	14.526.490	-1.05	0	-29	0.003	U	R.SVYQPQQCMNAK.G
		7.353.297	14.686.449	14.686.439	0.68	0	31	0.0013	U	R.SVYQPQQCMNAK.G
LinJ35_V3.0990	0.24	5.818.262	11.616.378	11.616.394	-1.39	0	20	0.033	U	R.VAGGVFTLDGVK.Y
		6.806.753	20.390.041	20.390.034	0.33	0	-57	9.8e-06	U	R.MAIPTGEFLSVEGTGLDFR.Q
		6.860.085	20.550.036	20.549.983	2.59	0	61	4.4e-06	U	R.MAIPTGEFLSVEGTGLDFR.Q
LinJ28_V3.3090	0.19	5.063.082	10.106.018	10.106.012	0.67	0	40	0.00011	U	R.LLDIEPALK.A

		4.646.068	13.907.986	13.907.933	3.85	0	56	3.3e-06	U	R.GVLLGPTTHVELR.L
LinJ35_V3.3390	0.19	5.367.919	10.715.692	10.715.672	1.81	0	32	0.0039	U	R.AAQLESQGLR.F
		5.742.760	11.465.375	11.465.339	3.08	0	29	0.0039	U	K.EIVAGLDDCR.Q
		9.624.679	19.229.212	19.229.084	6.68	0	38	0.00074	U	K.AFEENPSLPNLMDAFTK.E
LinJ21_V3.0300	0.19	5.816.324	17.418.753	17.418.669	4.84	0	65	1.3e-06	U	R.IAGVDVTDMSDLHTIR.E
		5.859.785	17.549.137	17.549.163	-1.45	0	69	6.3e-07	U	K.NVEGNDVVELLQASLR.R
		5.869.631	17.578.674	17.578.618	3.17	0	-43	0.00031	U	R.IAGVDVTDMSDLHTIR.E
LinJ12_V3.0490	0.15	5.807.988	11.595.831	11.595.833	-0.17	0	32	0.0034	U	K.ANNISTDGAVAK.H
		5.356.372	16.038.898	16.038.821	4.80	0	57	5.8e-06	U	K.QVNLEETIFIASK.T
		8.294.657	16.569.168	16.569.087	4.94	0	40	0.00022	U	K.VLGATDSSLLSLPAWK.R
LinJ18_V3.0510	0.13	4.437.719	8.855.293	8.855.284	1.04	0	42	0.00021	U	R.VLLESAVR.N
		9.214.599	18.409.052	18.408.996	3.08	0	41	0.0004	U	K.FVEFYGPGVDALSVADR.A
		10.455.442	20.890.738	20.890.701	1.81	0	-56	1.5e-05	U	R.VVLQDFTGVPCVVDLAAMR.D
		6.973.653	20.890.741	20.890.701	1.92	0	61	4.1e-06	U	R.VVLQDFTGVPCVVDLAAMR.D
LinJ24_V3.0870	0.12	5.546.390	16.608.951	16.608.896	3.28	0	68	6.6e-07	U	K.VATPEQAQEVHALLR.K
LinJ34_V3.0080	0.10	7.730.402	23.160.988	23.160.910	3.40	0	33	0.002	U	K.SSAELSQALEPPFFDESQLYR.I
		8.080.810	24.212.212	24.212.176	1.48	0	67	1.1e-06	U	R.LPDAYESLINDALLGNSTNFVR.K
LinJ29_V3.2080	0.10	4.452.584	13.327.533	13.327.514	1.49	0	59	3.5e-06	U	K.VNPEALTILHR.A
		8.914.591	26.713.555	26.713.493	2.32	0	31	0.004	U	K.SGIYIEQLEQNPAQYLPDIPEVR.L
LinJ11_V3.1000	0.09	4.482.355	8.944.565	8.944.559	0.58	0	44	0.00015	U	R.SATGVAFSR.S
		4.627.504	9.234.862	9.234.865	-0.29	0	36	0.0012	U	R.GDFIGLFR.A
		7.353.866	22.031.380	22.031.373	0.32	0	36	0.0009	U	R.DPFQSLDQEGVLLVSTAVTK.G
LinJ19_V3.0710	0.09	5.783.608	11.547.070	11.547.023	4.07	0	91	1.2e-09	U	R.LLGVSLLDGLR.A
LinJ23_V3.0580	0.08	4.928.077	9.836.009	9.836.015	-0.66	0	18	0.031	U	R.VVELANVLK.Y
		7.994.362	15.968.579	15.968.512	4.22	0	59	5.8e-06	U	R.VLGSVGEVINVEAWK.W
LinJ30_V3.2990	0.08	7.729.220	15.438.294	15.438.246	3.11	0	71	3.9e-07	U	R.VPTPDVSVVDLTFR.A
LinJ28_V3.2600	0.07	4.267.881	8.515.616	8.515.593	2.75	0	36	0.00028	U	R.GLVVPVIR.D
LinJ32_V3.1660	0.07	7.814.105	15.608.065	15.608.035	1.91	0	25	0.018	U	R.IADGDAQLLEEFK.Q

*Metabolismo de nucleotídeos*

LinJ32_V3.3100	15.55	4.642.868	9.265.591	9.265.549	4.48	0	47	8.1e-05	U	R.GLVGEIIR.F	
		4.682.357	9.344.568	9.344.509	6.37	0	47	9.2e-05	U	R.GDFAVDVGR.N	
		4.707.508	9.394.870	9.394.854	1.71	0	37	0.00073	U	R.EIAFWFK.A	
		4.442.571	13.297.495	13.297.405	6.78	0	69	4.4e-07	U	R.TFIAVKPDGVQR.G	
		6.658.830	13.297.514	13.297.405	8.23	0	-47	6.9e-05	U	R.TFIAVKPDGVQR.G	
		4.836.124	14.478.154	14.478.075	5.43	0	45	8.3e-05	U	K.DLSSKPPFPALVK.Y	
		5.162.240	15.456.502	15.456.478	1.54	0	76	2.3e-08	U	R.NVCHGSDSVESAER.E	
								1,00E-			
								06		U	R.NVCHGSDSVESAER.E
								92	2.6e-09	U	K.ILQPTTEQAQGHYK.D
								-65	1.2e-06	U	K.ILQPTTEQAQGHYK.D
								-72	1.9e-07	U	R.VLLGATNPADSQPGTIR.G
								96	7.3e-10	U	R.VLLGATNPADSQPGTIR.G
								-20	0.028	U	K.YFSSGPIVCMVWEGK.N
								96	6.1e-10	U	K.YFSSGPIVCMVWEGK.N
								-43	0.00012	U	K.ADEIASWTSHSVSQUIYE.-
								70	2.3e-07	U	K.ADEIASWTSHSVSQUIYE.-
LinJ36_V3.6770	1.67	3.822.099	7.624.052	7.624.024	3.71	0	42	0.00038	U	R.AIGEFAR.S	
		3.991.929	7.963.713	7.963.690	2.80	0	16	0.036	U	R.CWIYR.Y	
		4.347.463	8.674.781	8.674.749	3.65	0	36	0.00043	U	R.MVQVVHR.H	
		5.543.160	11.066.174	11.066.084	8.14	0	62	1.9e-06	U	R.TIQSATAFLR.G	
		5.993.345	11.966.544	11.966.513	2.57	0	-43	0.00018	U	R.TIADNKPVPSR.C	
		3.998.921	11.966.544	11.966.513	2.61	0	57	7.4e-06	U	R.TIADNKPVPSR.C	
								5,00E-			
								07		U	R.ASAGICPLDDFR.R
								85	1.2e-08	U	R.ASAGICPLDDFR.M
								-41	0.00029	U	R.QTGIEAHCIDAAGIR.Y
								77	8.5e-08	U	R.QTGIEAHCIDAAGIR.Y
								-68	3.3e-07	U	K.DAWIEGLCTDFNAR.T
								80	2.2e-08	U	K.DAWIEGLCTDFNAR.T

		8.484.320	16.948.495	16.948.490	0.25	0	66	1,00E-06	U	K.AVYPGLMEVNAAWFK.Y
		8.564.307	17.108.469	17.108.439	1.72	0	-55	1.6e-05	U	K.AVYPGLMEVNAAWFK.Y
		8.974.461	17.928.777	17.928.699	4.31	0	94	2.2e-09	U	R.TTDMLLSTDAVPSVMGR.S
		6.039.628	18.088.667	18.088.649	1.00	0	-39	0.00058	U	R.TTDMLLSTDAVPSVMGR.S
		6.092.963	18.248.672	18.248.598	4.04	0	-22	0.025	U	R.TTDMLLSTDAVPSVMGR.S
		9.134.409	18.248.673	18.248.598	4.12	0	-77	6.9e-08	U	R.TTDMLLSTDAVPSVMGR.S
		9.349.512	18.678.878	18.678.781	5.18	0	107	6.7e-11	U	R.GLFQDDYFYPVVYSR.N
		6.236.376	18.678.909	18.678.781	6.84	0	-100	3.1e-10	U	R.GLFQDDYFYPVVYSR.N
		10.479.897	20.939.649	20.939.550	4.73	0	117	4.6e-12	U	R.TSCVLYMYDVAAAFEAAAGR.L
								9,00E-		
		6.989.956	20.939.650	20.939.550	4.75	0	-94	10	U	R.TSCVLYMYDVAAAFEAAAGR.L
		8.564.409	25.663.009	25.662.921	3.42	0	105	1.8e-10	U	K.LDLTQGSASQNLAQTMLANINHR.L
LinJ05_V3.0830	0.56	3.997.596	7.975.047	7.975.011	4.52	0	42	0.00012	U	R.IAPLVASK.Y
		6.298.350	12.576.555	12.576.540	1.18	0	59	5.4e-06	U	K.VDGVPCVFLPR.H
		4.709.336	14.097.790	14.097.779	0.75	0	43	0.0001	U	R.IFNNIAHEALLR.C
		4.629.705	18.478.529	18.478.452	4.17	0	43	0.00014	U	R.HGPHHQYNPSEINYR.A
		6.169.583	18.478.531	18.478.452	4.31	0	-22	0.018	U	R.HGPHHQYNPSEINYR.A
LinJ35_V3.2200	0.34	3.802.247	7.584.348	7.584.286	8.19	0	34	0.0042	U	R.ILAETGR.L
		3.922.534	7.824.922	7.824.902	2.64	0	16	0.025	U	R.LIEALPK.A
		4.697.549	9.374.953	9.374.943	1.06	0	24	0.01	U	R.VLYDGLMK.G
		4.784.815	19.098.969	19.098.894	3.95	0	46	7.7e-05	U	R.VTHAEPFFDPQGHLCR.G
LinJ14_V3.0130	0.08	9.261.259	27.753.559	27.753.524	1.26	0	22	0.034	U	R.LDPEVFDVVGSETEPAITIMGGASEAK.G
LinJ03_V3.0510	0.01	3.447.044	6.873.943	6.873.915	3.98	0	22	0.042	U	R.IADTLR.L
<i>Degradação protéica</i>										
LinJ33_V3.2670	1.09	3.551.798	7.083.451	7.083.442	1.19	0	31	0.0021		R.YEIER.D
		3.792.335	7.564.524	7.564.494	4.04	0	21	0.039	U	R.DLVALAR.E
		5.288.021	10.555.897	10.555.863	3.26	0	49	5.1e-05	U	R.TGELGPLLEK.Q
		5.517.798	11.015.450	11.015.414	3.26	0	39	0.00062	U	K.GSEELNAVQR.A
		5.548.084	11.076.023	11.075.965	5.25	0	53	1.9e-05	U	R.FGFITAPEVK.S 1066

		3.026.644	12.066.285	12.066.258	2.23	0	25	0.02	U	R.LTTHAHSVWR.D
		4.065.293	12.165.661	12.165.625	2.90	0	45	7.2e-05	U	K.IWHFDTDAGR.L
		6.098.300	12.176.455	12.176.404	4.15	0	69	8.5e-07	U	K.SATALPAEFVGR.K 1177
		6.122.907	12.225.669	12.225.686	-1.38	0	18	0.04	U	R.GEAMAMLSELR.F
		4.422.203	13.236.391	13.236.354	2.82	0	53	1.8e-05	U	R.EHITQPVCNAR.S
		6.823.488	13.626.831	13.626.779	3.79	0	72	3.5e-07	U	R.ATGETLNPEYLR.R 1380
		6.923.325	13.826.505	13.826.500	0.36	0	40	0.00033	U	K.MQEYLGLSTEGR.D
		4.772.442	14.287.108	14.287.072	2.54	0	31	0.0034	U	R.LDVSPHPFTGMTK.E
		6.003.114	17.979.124	17.979.084	2.24	0	57	8.7e-06	U	R.VDADEVVCYPLHVILR.Y
LinJ26_V3.1550	0.87	3.111.900	6.203.655	6.203.646	1.41	0	24	0.0097	U	K.IYGIR.A
		4.277.131	8.534.117	8.534.116	0.04	0	58	4.9e-06	U	R.MATFAGTR.V
		4.357.121	8.694.096	8.694.065	3.57	0	-24	0.0066	U	R.MATFAGTR.V
		5.047.374	10.074.602	10.074.594	0.88	0	35	0.00079	U	R.TEAGECTLK.M
		5.052.483	10.084.820	10.084.811	0.94	0	63	1.3e-06	U	R.AMAQAFTNR.A
		5.452.715	10.885.284	10.885.250	3.10	0	53	1.8e-05	U	R.EPNNEAFLR.N
		5.532.786	11.045.427	11.045.485	-5.26	0	42	0.00033	U	K.TVAACEDLVK.A
		6.283.543	12.546.941	12.546.932	0.70	0	63	1.6e-06	U	K.GVPESVLSALQR.T
		6.933.798	13.847.451	13.847.391	4.35	0	60	5.8e-06	U	K.VFALDLFEYIR.S
		8.309.373	16.598.601	16.598.542	3.56	0	93	2.4e-09	U	K.TPEMAQAFVESLIPK.L
		6.136.378	18.378.916	18.378.846	3.81	0	-54	1.8e-05	U	R.DNLNTTQLFYDLEPR.V
		9.199.531	18.378.917	18.378.846	3.85	0	104	1.8e-10	U	R.DNLNTTQLFYDLEPR.V
		9.499.561	18.978.977	18.979.058	-4.26	0	-93	2.1e-09	U	R.VVELETFSIDNFESNR.Q
		6.336.441	18.979.105	18.979.058	2.49	0	97	7.9e-10	U	R.VVELETFSIDNFESNR.Q
		7.273.512	21.790.318	21.790.290	1.28	0	37	0.00062	U	R.YVDCIIGVGGSQDPNDMLVK.F
		7.907.353	23.691.840	23.691.824	0.67	0	33	0.0018	U	K.TLLNVSETAIQEYFPMDATVK.A
LinJ13_V3.0090	0.45	3.551.798	7.083.451	7.083.442	1.19	0	31	0.0021		R.YEIER.A
		3.925.211	11.745.414	11.745.401	1.18	0	28	0.0035	U	R.SMTIHESQSR.F
		7.083.574	14.147.003	14.146.980	1.61	0	79	5.9e-08	U	R.ITTAYDLQDFTK.G
		7.193.748	14.367.351	14.367.300	3.56	0	52	3.2e-05	U	R.SNNDNFATFLPALK.E

		7.704.076	15.388.006	15.387.981	1.68	0	52	2.2e-05	U	R.DAGLEVVAPEAPFPK.D
		7.728.848	15.437.551	15.437.552	-0.05	0	94	1.7e-09	U	R.ALIEGTMEAEDIPR.V
								6,00E-		
		5.336.182	15.978.328	15.978.286	2.64	0	59	06	U	R.ADEV CYPLHILLR.Y
LinJ05_V3.0960	0.43	3.437.147	6.854.148	6.854.123	3.75	0	25	0.022	U	R.VVAELR.K
		5.082.940	10.145.735	10.145.710	2.47	0	64	2.6e-06	U	K.EGVLITLDR.E
		5.237.882	10.455.619	10.455.597	2.11	0	36	0.0018	U	K.FVAELPWGK.A
		6.758.334	13.496.522	13.496.463	4.38	0	26	0.01	U	R.EDAAVANDFLASK.K
		6.978.865	13.937.584	13.937.565	1.36	0	56	8.1e-06	U	R.APNPIVQITENAK.E
		4.692.631	14.047.674	14.047.613	4.39	1	52	2.4e-05	U	R.VFKEEDGTLVIR.V
		7.123.788	14.227.430	14.227.395	2.49	0	51	3.7e-05	U	R.AGLV GLEFYTPEK.Q
		5.716.217	17.118.433	17.118.417	0.90	0	-62	2.7e-06	U	R.EFAGSVEGVVESFVTR.H
		8.569.299	17.118.452	17.118.417	2.02	0	93	2.1e-09	U	R.EFAGSVEGVVESFVTR.H
LinJ29_V3.0860	0.38	5.692.709	11.365.272	11.365.285	-1.11	0	65	1.1e-06	U	R.YCTLGGVPDR.R
		4.305.725	12.886.957	12.886.888	5.36	0	22	0.027	U	K.HVSGDLLGGHAVK.L
		4.318.846	12.926.320	12.926.296	1.89	1	33	0.0022	U	R.YCTLGGVPDRR.I
		7.373.256	22.089.550	22.089.528	1.01	0	89	1.4e-09	U	R.DQSNCGSCWAIAAVEAISDR.Y
LinJ35_V3.0770	0.28	4.447.434	8.874.723	8.874.712	1.16	0	61	5.1e-06	U	K.VVSDLEAR.A
		4.692.353	14.046.840	14.046.786	3.87	0	48	5.7e-05	U	R.EFQQLHDIYR.A
LinJ34_V3.4390	0.27	6.943.729	13.867.313	13.867.289	1.71	0	66	1.4e-06	U	R.AQAVQILTDCLR.V
		5.855.265	23.380.769	23.380.688	3.44	0	53	1.5e-05	U	R.MYHNVDELSPSEVFSYLHR.S
LinJ21_V3.2070	0.27	3.872.306	7.724.466	7.724.443	3.03	0	36	0.0019	U	R.VLIDSAR.K
		6.033.327	12.046.509	12.046.452	4.70	0	66	1.2e-06	U	R.FEVLSVDQLR.D
LinJ14_V3.0910	0.25	5.453.021	10.885.897	10.885.866	2.86	0	48	8.1e-05	U	K.ISFEANPIAK.A
LinJ14_V3.0180	0.23	3.551.798	7.083.451	7.083.442	1.19	0	31	0.0021		R.YEIER.D
		4.497.546	8.974.947	8.974.920	3.00	0	43	0.00011	U	R.LEAVDVPR.V
		4.777.535	9.534.925	9.534.930	-0.59	0	28	0.0047	U	K.ATGEPLNPR.H
		5.499.752	16.469.038	16.468.991	2.86	0	57	4.7e-06	U	R.LHELASQLPELLR.R
LinJ28_V3.0110	0.14	8.459.480	16.898.814	16.898.767	2.83	0	38	0.00078	U	R.FGPWFVEPVIGSIDK.S

LinJ02_V3.0710	0.13	4.662.470	9.304.795	9.304.770	2.61	0	45	0.00024	U	R.ASLAGEDLR.L
		3.158.315	9.444.727	9.444.716	1.22	0	36	0.0015	U	R.LVEHYER.E
		7.100.001	21.269.785	21.269.732	2.53	0	47	3.9e-05	U	R.VLDCDGFWEFLENGGLTR.E
LinJ35_V3.2400	0.12	4.572.517	9.124.889	9.124.858	3.38	0	20	0.023	U	K.SFFFIPR.L
		4.632.365	13.866.877	13.866.892	-1.05	0	43	0.00021	U	K.TIYNAVLDHAHDR.V
LinJ11_V3.0640	0.11	5.177.838	10.335.531	10.335.556	-2.48	0	37	0.00099	U	R.AAFTQELVR.G
		6.928.622	13.837.098	13.837.106	-0.58	0	89	5.9e-09	U	R.APAGSETAVANAVAR.A
LinJ35_V3.4910	0.11	3.499.127	13.956.217	13.956.167	3.55	1	24	0.0071	U	R.AREEASDYHYR.Y
LinJ12_v4.0030	0.10	6.388.119	12.756.092	12.756.055	2.94	0	92	2.6e-09	U	R.SGSAADTQALAER.V
LinJ10_V3.0490	0.10	4.477.374	8.934.602	8.934.607	-0.49	0	29	0.0043	U	R.YDQLVTR.V
		6.403.046	19.178.921	19.178.891	1.55	0	50	3.1e-05	U	R.IAVSTEDLTDPAYHCAR.V
LinJ31_V3.0450	0.08	5.122.462	10.224.779	10.224.781	-0.22	0	28	0.0051	U	R.SQASDAAAFR.A
		3.481.761	10.415.064	10.415.025	3.73	0	26	0.0054	U	R.IDAICAHSR.A
LinJ19_V3.1460	0.08	6.178.191	12.336.236	12.336.209	2.18	0	68	9.5e-07	U	R.LAMGSNQCLLK.N
LinJ31_V3.2060	0.06	8.084.528	16.148.911	16.148.869	2.61	0	75	1.1e-07	U	R.TPFLVVEIAGTEPTK.N
LinJ20_V3.1210	0.06	7.108.890	14.197.634	14.197.610	1.72	0	51	3.1e-05	U	R.SVLVDSYLPVSGGK.L
		8.209.303	16.398.460	16.398.457	0.21	0	37	0.00098	U	K.SATDPAEIWPAILEK.A
LinJ29_V3.2350	0.06	5.973.308	11.926.471	11.926.452	1.59	0	48	5.5e-05	U	R.SLFSDTLAAIR.M
		6.139.850	18.389.331	18.389.349	-0.98	0	32	0.0026	U	R.TWCVPLVVEGIDPAAGR.A
LinJ33_V3.2700	0.06	6.613.526	19.810.360	19.810.302	2.89	0	79	5.4e-08	U	R.APIEVSSILCLADNAVGP.R.S
LinJ31_V3.3210	0.05	5.239.555	15.688.447	15.688.410	2.38	0	-62	2.8e-06	U	R.SADEVLSLIEGPLAR.M
		7.854.296	15.688.447	15.688.410	2.39	0	76	1.2e-07	U	R.SADEVLSLIEGPLAR.M

*Metabolismo de aminoácidos*

LinJ34_V3.4230	0.58	3.956.973	7.893.800	7.893.770	3.91	0	37	0.0011	U	R.GFQDAPR.F
		4.667.841	9.315.536	9.315.491	4.85	0	49	3.4e-05	U	R.ELGVVLF.R.V
		6.002.839	11.985.532	11.985.475	4.77	0	41	0.00013	U	R.VSMSDFCVVR.Q
		5.002.697	14.977.873	14.977.762	7.41	0	22	0.031	U	K.AGDLVVLPAAGMYHR.A
		7.723.698	15.427.251	15.427.202	3.17	0	59	3.7e-06	U	R.ATLDEDDYVALYR.G
LinJ35_V3.3280	0.50	3.281.818	6.543.490	6.543.490	0.12	0	25	0.0061	U	R.VFFSR.L

		4.822.676	9.625.207	9.625.186	2.19	0	58	9.7e-06	U	K.VGITDGFVR.V
		6.288.455	12.556.765	12.556.772	-0.57	0	40	0.00054	U	R.SANPTVAVLEQK.L
		4.325.767	12.947.082	12.947.034	3.77	0	25	0.0096	U	R.VVYPGLASHPQK.E
		8.594.403	17.168.661	17.168.604	3.30	0	98	9.3e-10	U	R.VSCGIEDVDDLIAALK.I
		5.732.963	17.168.671	17.168.604	3.93	0	-75	1.9e-07	U	R.VSCGIEDVDDLIAALK.I
LinJ28_V3.3140	0.28	3.317.036	6.613.927	6.613.911	2.31	0	21	0.028	U	R.VIQFR.V
		3.717.083	7.414.021	7.414.021	-0.01	0	26	0.0051	U	R.IVEPER.V
		5.587.925	11.155.704	11.155.652	4.71	0	32	0.0029	U	K.FLGFEQTFK.N
		7.398.916	14.777.687	14.777.639	3.20	0	49	5.4e-05	U	R.EVMTSLWPFLQK.N
LinJ36_V3.4100	0.28	4.042.764	8.065.382	8.065.378	0.57	0	15	0.031	U	R.HIILLAK.G
		4.397.603	8.775.061	8.775.062	-0.12	0	25	0.0083	U	K.AGVFFLPK.A
		4.877.768	9.735.390	9.735.385	0.51	0	26	0.013	U	K.AGVPVFAWK.G
		5.097.637	10.175.129	10.175.131	-0.24	0	25	0.016	U	R.EYGPSQPLK.G
LinJ03_V3.0190	0.16	4.677.546	9.334.947	9.334.953	-0.73	0	26	0.016	U	R.AVTMLGQSK.N
		3.928.640	11.755.702	11.755.723	-1.81	0	37	0.0007	U	R.LETYHNFPR.I
		6.988.738	13.957.330	13.957.286	3.17	0	33	0.0019	U	R.GYFVEPTIETK.D
LinJ36_V3.6170	0.16	6.098.598	12.177.051	12.177.020	2.54	0	28	0.0037	U	K.TLGVFELLQAK.E
		7.953.992	23.831.757	23.831.730	1.14	0	38	0.00083	U	R.LTGTLPSSFDYEELVAMVQQR.L
LinJ35_V3.0840	0.14	5.047.720	10.075.295	10.075.287	0.70	0	22	0.013	U	R.TVYDELLR.L
		4.632.072	13.865.998	13.865.986	0.85	0	41	8.3e-05	U	R.EEYTCPPAHGAR.L
LinJ34_V3.3140	0.13	7.788.415	15.556.684	15.556.653	1.99	0	21	0.0094	U	R.FESEGPFTHMFDI.-
LinJ35_V3.1490	0.09	7.600.753	22.772.041	22.772.039	0.12	0	82	2.2e-08	U	R.LVALDVVECNPLLAATESHVK.D
LinJ36_V3.3750	0.09	7.919.332	15.818.519	15.818.515	0.24	0	34	0.0014	U	K.IQGIGPGFVPDVLDR.S
LinJ01_V3.0500	0.08	9.640.259	19.260.372	19.260.422	-2.58	0	79	4.5e-08	U	R.LASALSSPVNDLTLADIAR.L
LinJ20_V3.0980	0.08	5.933.541	11.846.937	11.846.917	1.67	0	32	0.0016	U	R.AIFLQLPVER.A
LinJ30_V3.3560	0.07	3.655.164	10.935.273	10.935.265	0.77	0	35	0.001	U	R.GGPHGDAGLTGR.K
LinJ12_V3.0580	0.06	7.044.151	14.068.156	14.068.133	1.67	0	55	3.4e-06	U	R.ITILPPLEQIDR.M
<i>Atividade antioxidante</i>										
LinJ15_V3.1140	5.40	3.832.306	7.644.466	7.644.432	4.48	0	40	0.00013		K.ISLAAYK.G



		4.257.379	8.494.613	8.494.596	1.98	0	46	6.7e-05	U	R.AYGVLAEK.Q
		4.297.405	8.574.665	8.574.607	6.77	0	28	0.012		R.NVEEVLR.L
		5.992.781	11.965.416	11.965.397	1.61	0	50	2.5e-05		K.HGEVCPANWK.K
		3.998.545	11.965.416	11.965.397	1.65	0	-25	0.0079		K.HGEVCPANWK.K
		6.123.407	12.226.668	12.226.598	5.79	0	76	8.8e-08		R.LLEAFQFVEK.H
		6.153.228	12.286.311	12.286.234	6.24	0	64	2.3e-06		R.QITVNDMPVGR.N
		6.233.175	12.446.205	12.446.183	1.71	0	-45	0.00014		R.QITVNDMPVGR.N
		6.663.595	13.307.044	13.307.067	-1.73	0	-36	0.0018		R.GLFIIDPNGMVR.Q
		6.728.567	13.436.988	13.436.941	3.51	0	49	6.9e-05		K.GGLGAMAIPMLADK.T
		6.743.615	13.467.085	13.467.017	5.06	0	42	0.0004		R.GLFIIDPNGMVR.Q
		6.808.497	13.596.848	13.596.890	-3.12	0	-32	0.0043		K.GGLGAMAIPMLADK.T
								8,00E-		
		7.400.281	22.170.624	22.170.598	1.16	0	67	07		K.INCPAPPFEEVALMPNGSFK.K
		11.104.988	33.284.745	33.284.587	4.75	0	30	0.0009		R.FNELNCEVLACSMSEY AHLQWTLQDR.K
LinJ15_V3.1100	5.34	3.832.306	7.644.466	7.644.432	4.48	0	40	0.00013		K.ISLAAYK.G
		4.297.405	8.574.665	8.574.607	6.77	0	28	0.012		R.NVEEVLR.L
		4.547.416	9.074.687	9.074.651	3.96	0	39	0.00044	U	R.AYGVLEEK.Q
		5.992.781	11.965.416	11.965.397	1.61	0	50	2.5e-05		K.HGEVCPANWK.K
		3.998.545	11.965.416	11.965.397	1.65	0	-25	0.0079		K.HGEVCPANWK.K
		6.123.407	12.226.668	12.226.598	5.79	0	76	8.8e-08		R.LLEAFQFVEK.H
		6.153.228	12.286.311	12.286.234	6.24	0	64	2.3e-06		R.QITVNDMPVGR.N
		6.233.175	12.446.205	12.446.183	1.71	0	-45	0.00014		R.QITVNDMPVGR.N
		6.663.595	13.307.044	13.307.067	-1.73	0	-36	0.0018		R.GLFIIDPNGMVR.Q
		6.728.567	13.436.988	13.436.941	3.51	0	49	6.9e-05		K.GGLGAMAIPMLADK.T
		6.743.615	13.467.085	13.467.017	5.06	0	42	0.0004		R.GLFIIDPNGMVR.Q
		6.808.497	13.596.848	13.596.890	-3.12	0	-32	0.0043		K.GGLGAMAIPMLADK.T
								8,00E-		
		7.400.281	22.170.624	22.170.598	1.16	0	67	07		K.INCPAPPFEEVALMPNGSFK.K
		11.104.988	33.284.745	33.284.587	4.75	0	30	0.0009		R.FNELNCEVLACSMSEY AHLQWTLQDR.K
LinJ29_V3.1250	3.07	4.372.564	8.724.983	8.724.967	1.77	0	43	0.00025	U	R.NVVEALTK.Q

		4.642.472	9.264.798	9.264.749	5.31	0	25	0.012	U	K.LVEFYEK.H
		6.243.316	12.466.487	12.466.420	5.34	0	56	1.2e-05	U	K.MPWLSIPFEK.R
		6.323.256	12.626.367	12.626.369	-0.18	0	-40	0.00051	U	K.MPWLSIPFEK.R
		6.856.473	20.539.200	20.539.130	3.42	1	75	5.4e-08	U	R.HALTQDPEGEQFPWRDE.-
		7.250.530	21.721.371	21.721.274	4.46	0	112	2.7e-11	U	K.VESIPTLIGLNADTGDVTTR.A
		10.870.759	21.721.373	21.721.274	4.55	0	-102	2.9e-10	U	K.VESIPTLIGLNADTGDVTTR.A
		8.647.920	25.913.541	25.913.443	3.81	1	44	0.00012	U	K.QYKVESIPTLIGLNADTGDVTTR.A
LinJ23_V3.0050	1.27	4.032.461	8.044.776	8.044.745	3.86	0	31	0.00083	U	R.GLFIIDK.K
		4.087.158	8.154.170	8.154.137	4.07	0	33	0.0033	U	R.NVDEALR.V
		3.118.655	9.325.747	9.325.695	5.59	1	19	0.013	U	R.GLFIIDKK.G
		6.048.235	12.076.324	12.076.309	1.23	0	61	2.9e-06	U	R.HSTINDLPVGR.N
		4.795.924	14.357.554	14.357.493	4.22	0	39	0.00062	U	K.GGLGEMHIPVLADK.S
		5.122.773	15.338.100	15.338.038	4.02	0	80	5.3e-08	U	R.DYGV LIEESGIALR.G
								3,00E-		
		7.679.124	15.338.103	15.338.038	4.19	0	-72	07	U	R.DYGV LIEESGIALR.G
LinJ32_V3.1910	0.73	3.942.502	7.864.859	7.864.851	1.00	0	28	0.004	U	K.SLVDIK.S
		6.668.438	13.316.731	13.316.681	3.76	0	108	7.1e-11	U	K.LNAAAESNSGLASK.S
		6.176.658	18.499.755	18.499.727	1.53	0	60	4.3e-06	U	M.PFAVQPLPYPHDALASK.G
		7.623.740	22.841.002	22.841.012	-0.42	0	69	5.6e-07	U	R.GGGEPSGPLASAI VDSFGSFASF.K
LinJ05_V3.0350	0.66	4.122.024	8.223.902	8.223.872	3.70	0	30	0.0037	U	R.GFDTEVR.K
		4.517.516	9.014.886	9.014.869	1.94	0	32	0.0037	U	R.SQALQLDK.A
		5.767.994	11.515.842	11.515.822	1.71	0	61	2.7e-06	U	K.VVNSINESYK.S
		5.817.772	11.615.399	11.615.342	4.88	0	32	0.0017	U	R.TPAYFYESGK.R
		8.194.115	16.368.084	16.368.057	1.70	0	85	1.7e-08	U	K.TSVDNIYAIGDVTNR.V
		6.192.930	24.731.430	24.731.366	2.60	0	68	4.4e-07	U	K.ISDFHSTIGVHPTS AEELCSMR.T
		8.580.703	25.711.891	25.711.839	2.02	0	72	1.9e-07	U	R.LGVPGDEFCITSNEAFYLEDAPK.R
		9.101.052	27.272.938	27.272.850	3.24	1	47	7.9e-05	U	R.LGVPGDEFCITSNEAFYLEDAPK.M
		7.941.513	31.725.761	31.725.564	6.21	1	59	6.2e-06	U	R.KSEDPHSDVLETLDTEYILIATGSWPTR.L
LinJ08_V3.0300	0.40	7.568.925	15.117.705	15.117.660	2.96	0	81	3.4e-08	U	R.YPAELPTLGFNYK.D

		5.602.977	16.778.714	16.778.672	2.46	0	64	2.5e-06	U	K.TIEEILATSGSTESK.V
		8.399.433	16.778.720	16.778.672	2.87	0	-61	4.5e-06	U	K.TIEEILATSGSTESK.V
LinJ06_V3.1090	0.21	4.272.080	8.524.015	8.523.977	4.39	0	38	0.00034	U	R.IDASEYR.G
LinJ33_V3.0260	0.20	3.437.147	6.854.148	6.854.123	3.75	0	24	0.029	U	R.VEIVAR.E
		5.102.726	15.277.960	15.277.893	4.41	1	48	8.6e-05	U	R.ETVPTLEVGNADKR.F
		7.664.205	15.308.264	15.308.228	2.33	0	69	5.5e-07	U	R.MNAGDVAILPFLVR.A
LinJ29_V3.1240	0.19	6.878.501	13.736.856	13.736.802	3.98	0	46	0.00011	U	K.MPWLALPFEDR.K
LinJ27_V3.1770	0.08	5.998.016	11.975.886	11.975.852	2.81	0	38	0.00064	U	K.LCVLFDEFER.F
		7.028.692	14.037.239	14.037.238	0.07	0	63	2.4e-06	U	R.LFAIPEEFWPR.I
LinJ36_V3.7280	0.06	6.138.127	12.256.108	12.256.132	-1.93	0	29	0.0053	U	K.FPAFVVDFER.R
<i>Outros processos</i>										
LinJ31_V3.2210	3.11	3.997.598	7.975.050	7.975.011	4.98	0	29	0.0023	U	K.NLITIPK.S 674
		4.362.736	8.705.326	8.705.287	4.53	0	53	2.6e-05	U	K.TAAQVILR.W
		4.497.375	8.974.604	8.974.596	0.92	0	31	0.0018	U	R.AFEQLYK.D
		4.767.533	9.514.920	9.514.913	0.76	0	41	0.00024	U	R.EDVFITTK.L
		5.022.630	10.025.114	10.025.094	2.04	0	47	0.00015	U	R.IDALNTNSR.Y
		5.162.613	10.305.080	10.305.043	3.60	0	41	0.00041	U	K.NEESVGAGLR.A
		5.162.805	10.305.465	10.305.447	1.71	0	38	0.001	U	R.HIDTAAIYK.N
		5.863.112	11.706.079	11.706.033	3.90	0	55	1.3e-05	U	K.VEAWSPLGQK.L
		6.409.013	12.797.881	12.797.863	1.35	0	24	0.0041	U	K.LLSNPILAAIGAK.Y
		6.250.056	18.719.950	18.719.934	0.87	0	82	2.8e-08	U	K.LGVYIDLYLIHWPR.G
		6.820.194	20.430.364	20.430.385	-1.02	1	56	1.3e-05	U	R.HIDTAAIYKNEESVGAGLR.A
		7.333.409	21.970.008	21.969.997	0.50	0	-52	1.5e-05	U	R.IEENADVFNFELGAEDVMR.I
		10.995.120	21.970.094	21.969.997	4.39	0	80	2.7e-08	U	R.IEENADVFNFELGAEDVMR.I
		7.443.492	22.300.257	22.300.178	3.55	0	-82	2.1e-08	U	K.LWNTEQGYESTLAAFEESR.Q
		11.160.205	22.300.265	22.300.178	3.88	0	116	8.8e-12	U	K.LWNTEQGYESTLAAFEESR.Q
LinJ06_V3.0010	1.72	4.897.687	9.775.229	9.775.182	4.80	0	37	0.00088	U	K.AYLEDIVR.C
		6.112.664	12.205.183	12.205.132	4.19	0	66	3.4e-07		R.CSTAYTEYAR.K
		6.598.461	13.176.777	13.176.711	5.02	0	58	9.3e-06		K.TVTACDVVNALR.K

		4.515.667	13.516.783	13.516.732	3.80	1	37	0.001	U	R.ISSDVYEEVRR.V
LinJ09_V3.1410	1.56	4.773.068	9.525.990	9.525.957	3.51	0	51	7.9e-06	U	R.IVLPaelak.H
		5.602.965	11.185.785	11.185.754	2.76	0	70	5.2e-07	U	R.ICTEAASIVR.A
		4.211.983	12.605.731	12.605.703	2.21	0	44	7.9e-05	U	K.AINAQMSMSHR.T
		7.198.560	14.376.975	14.376.922	3.68	0	83	2.1e-08	U	K.IVNSYVNDVMER.I
LinJ25_V3.0940	1.17	4.342.388	8.664.630	8.664.572	6.79	0	33	0.0014	U	R.VTMELFK.D
		4.862.305	9.704.464	9.704.396	7.05	0	52	1.2e-05	U	K.FADESFAGK.A
		6.243.073	12.466.001	12.465.942	4.70	0	48	5.6e-05	U	K.DAVPQTAENFR.A
		4.425.356	13.245.850	13.245.771	5.95	0	36	0.00037	U	K.GFGYANCPFHR.V
		5.636.402	16.878.988	16.878.934	3.19	0	81	4.8e-08	U	K.HVVFGQVLEGYDVVK.A
LinJ35_V3.2250	1.14	4.617.180	9.214.214	9.214.192	2.42	0	30	0.0035	U	R.LDEEFNR.K
		5.532.966	11.045.786	11.045.815	-2.63	0	45	0.00018	U	K.FAELLEQQK.A
		4.362.186	13.056.340	13.056.313	2.04	1	30	0.0055	U	K.LDRLDEEFNR.K
LinJ15_V3.0010	1.12	4.827.582	9.635.019	9.635.025	-0.69	0	38	0.00059	U	K.AYVEDIVR.C
		6.112.664	12.205.183	12.205.132	4.19	0	66	3.4e-07		R.CSTAYTEYAR.K
		6.598.461	13.176.777	13.176.711	5.02	0	58	9.3e-06		K.TVTACDVVNALR.K
LinJ09_V3.0970	1.02	4.032.152	8.044.159	8.044.164	-0.62	0	28	0.0077	U	K.ELGTVMR.S
		5.147.646	10.275.146	10.275.121	2.50	0	43	0.00014	U	R.HVMTNLGEK.L
		5.802.980	17.378.721	17.378.686	2.02	1	61	3.2e-06	U	R.VFDKDGNGFISAAELR.H
		6.156.383	18.438.931	18.438.840	4.94	1	61	3.2e-06	U	K.EAFSLFDKDGDTITTK.E
LinJ31_V3.1930	0.80	3.247.081	6.474.016	6.474.006	1.56	0	38	0.00037	U	R.LIFAGK.Q 554
		3.565.465	10.666.177	10.666.135	3.96	0	41	0.00017	U	K.ESLHLVLR.L
		8.794.642	17.569.138	17.569.094	2.48	0	53	3.3e-05	U	K.TIALEVEPSDTIENVK.A
LinJ27_V3.0620	0.70	3.812.205	7.604.264	7.604.265	-0.13	0	36	0.0023	U	K.SCLLLR.F
		4.957.486	9.894.826	9.894.818	0.85	0	42	0.00027	U	R.TITSSYR.G
		5.363.242	10.706.339	10.706.336	0.30	0	55	7.9e-06	U	K.LLLIGDSGVGK.S
		6.588.332	13.156.518	13.156.521	-0.17	0	41	0.00038	U	K.LQIWDTAGQER.F
LinJ24_V3.1560	0.57	4.307.007	8.593.869	8.593.824	5.17	0	37	0.0003	U	R.WDGETPR.F
		5.037.233	10.054.320	10.054.291	2.93	0	18	0.014	U	R.YTETSYDK.A

		5.392.889	10.765.632	10.765.615	1.62	0	42	0.00046	U	R.VVDVVYNNR.Y
LinJ10_V3.0900	0.52	6.583.400	13.146.655	13.146.608	3.56	0	72	3.6e-07	U	R.FANLGFTEAAFQ.Q
		6.588.367	13.156.588	13.156.554	2.56	0	55	1.4e-05	U	K.EQVQGVDAIMAR.F
LinJ29_V3.0520	0.45	3.802.036	7.583.927	7.583.923	0.55	0	32	0.003	U	R.GAIDDLR.M
		5.162.721	10.305.296	10.305.295	0.15	0	42	0.00032	U	K.IEVTEVGER.S
LinJ06_V3.0120	0.34	5.588.100	11.156.054	11.156.009	4.08	0	30	0.0059	U	K.VLDGMDVVLR.I
		7.390.229	22.140.468	22.140.416	2.37	0	27	0.007	U	R.VIPNFMIQGGDFTNFDGTGGK.S
LinJ31_V3.2890	0.34	5.443.141	10.866.136	10.866.107	2.69	0	61	4.6e-06	U	R.ILMVGLDAAGK.T
		7.750.875	23.222.407	23.222.359	2.09	0	65	9.8e-07	U	K.LGEVVTTIPTIGFNVETLEYK.N
LinJ31_V3.2670	0.31	4.372.341	8.724.536	8.724.504	3.70	0	32	0.0044	U	K.IPNPNYR.G
		5.067.599	10.115.052	10.115.059	-0.69	0	33	0.0017	U	K.LTCGGTYLK.F
		6.066.462	18.169.167	18.169.108	3.28	1	25	0.017	U	R.QIPNPAYKEDPNLYR.A
		4.917.762	19.630.758	19.630.738	0.99	1	24	0.011	U	K.VALSVGAIHVDAEKEQGLK.L
LinJ28_V3.2940	0.30	6.528.311	13.036.477	13.036.408	5.25	0	43	0.00027	U	K.DVLAVAFSPDDR.L
		4.905.659	14.686.758	14.686.695	4.31	0	16	0.056	U	R.HSVDSDYGLPSHR.L
		5.832.750	17.468.032	17.467.970	3.56	0	26	0.0076	U	R.VWNVAGECMHEFLR.D
LinJ31_V3.1070	0.23	4.265.919	12.767.538	12.767.503	2.77	0	74	3.7e-08	U	R.LAVLEVLHLDR.V
		8.559.020	17.097.894	17.097.784	6.41	0	70	2.4e-07	U	R.HTDGTLEDLSAEYLF.-
LinJ21_V3.1160	0.23	5.097.793	10.175.440	10.175.430	1.04	0	48	8.1e-05	U	K.CGLIFPVGR.V
LinJ10_V3.0920	0.22	7.609.003	15.197.861	15.197.817	2.91	0	56	1.4e-05	U	K.STSLLIQCAPFQR.L
LinJ19_V3.0190	0.18	3.862.285	7.704.424	7.704.399	3.31	0	35	0.00082	U	R.GAGANILR.G
		4.972.724	9.925.302	9.925.291	1.16	0	64	1.1e-06	U	K.TDGLVGLYR.G
LinJ35_V3.3210	0.15	7.338.899	14.657.652	14.657.664	-0.80	0	43	0.00024	U	R.SQSAFTTLEELIK.T
LinJ14_V3.1450	0.14	4.512.588	9.005.030	9.005.029	0.19	0	35	0.0016	U	R.SAIENVLR.A
		8.029.446	16.038.746	16.038.682	4.00	0	28	0.006	U	K.APAVPEGTPVVNALNR.Q
LinJ25_V3.1160	0.12	4.472.176	8.924.206	8.924.191	1.66	0	19	0.047	U	R.HAFESFR.M
		5.816.181	17.418.325	17.418.311	0.77	0	37	0.00079	U	R.IYVHESVYDEFVSR.L
LinJ13_V3.0160	0.11	3.897.087	7.774.029	7.774.021	0.99	0	20	0.039	U	R.IDFDLR.N
		6.122.907	12.225.669	12.225.686	-1.41	0	48	3.4e-05	U	R.MCLIEVSDTR.I

LinJ26_V3.2290	0.10	5.883.102	11.746.058	11.746.016	3.58	0	44	0.00026	U	K.VDLSVIQDMR.N
LinJ34_V3.4360	0.08	7.429.044	14.837.943	14.837.922	1.38	0	62	2.9e-06	U	R.AAALDVFDVEPLPK.D
LinJ33_V3.1470	0.07	5.376.281	16.098.625	16.098.576	3.04	0	42	0.00026	U	K.LLAHFNDNDNIIGLR.N
LinJ23_V3.1460	0.05	6.888.801	13.757.457	13.757.421	2.62	0	23	0.026	U	R.ILLLDPCPLEYK.K
LinJ32_V3.0410	0.05	3.811.860	11.405.362	11.405.346	1.40	0	21	0.024	U	R.IPCSSIHGDR.V
LinJ31_V3.1240	0.04	6.483.910	12.947.674	12.947.609	5.06	0	93	5.7e-10	U	R.VAIPVVNILDSR.V
LinJ28_V3.1310	0.04	8.957.790	26.843.151	26.843.082	2.58	0	24	0.02	U	K.SQIFSTYQDNQPSVLIQVFEGER.G
LinJ26_V3.0910	0.03	3.687.218	7.354.291	7.354.279	1.56	0	19	0.013	U	R.EHLIKP.-
<i>Hipotética</i>										
LinJ23_V3.1980	1.38	7.178.592	14.337.038	14.336.973	4.56	0	79	6.8e-08	U	R.ACDAVIADLSPFR.S
		4.789.086	14.337.040	14.336.973	4.66	0	-44	0.00021	U	R.ACDAVIADLSPFR.S
		6.357.130	19.041.172	19.041.095	4.05	0	81	7.3e-09	U	K.GVVPLIPVDNIATGALSIR.N
		9.530.659	19.041.173	19.041.095	4.09	0	-46	2.3e-05	U	K.GVVPLIPVDNIATGALSIR.N
		7.214.271	21.612.595	21.612.470	5.79	1	38	0.00016	U	K.EKGVVPLIPVDNIATGALSIR.N
LinJ26_V3.2710	0.93	4.417.457	8.814.768	8.814.760	1.01	0	36	0.00087	U	R.VAFGSFVR.T
		4.762.479	9.504.812	9.504.822	-0.97	0	28	0.0057	U	K.LVGSTFGDR.I
		4.792.720	9.565.295	9.565.291	0.36	0	42	0.00023	U	R.IDGTPTVVR.N
		5.983.585	11.947.025	11.946.972	4.42	0	71	1.2e-07	U	K.ELAVVLADPLR.A
		4.465.798	13.367.176	13.367.099	5.76	0	44	0.00015	U	R.QAIHEDALATLR.T
		4.889.505	14.638.297	14.638.249	3.26	0	51	1.5e-05	U	R.IPFHGGAVTVPTLR.S
		6.793.409	20.350.008	20.349.932	3.74	0	70	4.7e-07	U	R.NIAPDWIETAAMTVSSTTK.E
		10.185.077	20.350.008	20.349.932	3.75	0	-43	0.00021	U	R.NIAPDWIETAAMTVSSTTK.E
		6.987.204	20.931.394	20.931.269	5.94	0	108	3.4e-11	U	R.LVNVLSENTGLPVEAHFVR.K
LinJ08_V3.1220	0.93	5.087.907	10.155.669	10.155.662	0.66	0	52	05	U	R.QTISLEAVR.K
		6.078.356	12.136.566	12.136.554	0.98	0	49	6.7e-05	U	R.QVVLEADEIAK.A
		6.552.979	13.085.813	13.085.802	0.81	0	50	1.6e-05	U	K.QTCELTCIER.Q
		7.108.784	14.197.423	14.197.358	4.57	0	67	06	U	R.TIVTAAEFPGTASR.I
		5.656.564	16.939.473	16.939.363	6.50	0	71	1.2e-07	U	R.RPEVDPILDTVTALR.Q

		5.829.648	17.458.725	17.458.696	1.66	0	59	6.6e-06	U	R.IEAFAAEETAQGRPTR.Q
		6.653.241	19.929.505	19.929.463	2.10	0	38	0.00049	U	R.ICEPGTVDGGDVLYVANSK.Y
LinJ30_V3.2870	0.92	3.421.987	6.823.828	6.823.802	3.81	0	23	0.013	U	K.LFFTR.A
		4.779.129	14.307.169	14.307.095	5.15	0	81	4.1e-08	U	K.FIFLSNPDHWR.M
		7.473.915	22.391.526	22.391.518	0.36	1	33	0.0028	U	R.AMEAQLPLATSTAVNPSKDKPAK.F
LinJ18_V3.1640	0.54	4.022.437	8.024.729	8.024.701	3.43	0	35	0.00073	U	K.TPFALVR.K
		3.749.396	14.957.293	14.957.208	5.69	1	20	0.034	U	R.KDDPPHWFGE LR.T
								7,00E-		
LinJ33_V3.0660	0.50	7.168.690	14.317.235	14.317.205	2.06	0	68	07	U	R.LNEVLPDSTTSTR.S
		5.986.357	17.928.852	17.928.778	4.15	1	28	0.011	U	R.IKLDNQFCDLEGVSR.L
LinJ02_V3.0520	0.39	5.302.745	10.585.344	10.585.356	-1.16	0	36	0.0015	U	R.QDTIDALQR.A
		4.505.866	13.487.380	13.487.351	2.18	1	21	0.023	U	R.EKDTTQLIFVR.S
LinJ08_V3.0330	0.27	6.913.838	13.807.530	13.807.500	2.17	0	34	0.0014	U	K.DITLPEGAPVIEK.L
		7.453.613	22.330.622	22.330.581	1.81	0	24	0.016	U	K.LQPSMLVPEMMPYIDGDAAR.G
LinJ34_V3.1620	0.19	7.163.545	14.306.944	14.306.929	1.05	0	36	0.0011	U	K.SFTSTDADLLFSK.V
LinJ32_V3.0660	0.15	5.163.050	10.305.954	10.305.910	4.30	0	47	5.2e-05	U	R.ETLVSLEK.A
LinJ14_V3.0190	0.14	6.166.452	18.469.138	18.469.075	3.43	0	45	0.00015	U	R.QQFLQHTVNQSNFR.E
LinJ34_V3.2410	0.14	4.245.375	12.705.907	12.705.902	0.41	0	38	0.00042	U	R.DRPEGAENEVR.V
LinJ27_V3.1920	0.14	6.728.423	13.436.700	13.436.681	1.46	0	94	1.8e-09	U	R.VAQLSEEEAAAAR.T
LinJ35_V3.3750	0.13	6.193.479	18.550.219	18.550.204	0.82	0	32	0.002	U	K.GGPQLLEDVSGPLVPLHK.T
LinJ32_V3.0890	0.11	5.457.992	10.895.838	10.895.819	1.80	0	24	0.028	U	R.VPYVGGQVSGK.L
		5.722.914	17.138.523	17.138.508	0.87	0	55	1.6e-05	U	K.AASPDDALAIVTFMHR.V
LinJ11_V3.0880	0.07	7.609.113	15.198.081	15.198.035	3.05	0	23	0.018	U	R.ELYNLLQDPIFR.E
LinJ26_V3.1960	0.07	4.556.994	9.093.843	9.093.828	1.58	0	22	0.0057	U	R.SYPDADSR.F
		5.918.476	11.816.806	11.816.768	3.24	0	46	5.6e-05	U	R.LNPTQVELLR.D
LinJ13_V3.0250	0.05	4.357.739	8.695.332	8.695.334	-0.22	0	21	0.016	U	R.LEGVLLAR.I
LinJ36_V3.0270	0.05	3.647.533	7.274.920	7.274.956	-4.86	1	18	0.015	U	K.LLNKIK.N
LinJ36_V3.5330	0.03	4.877.855	9.735.564	9.735.556	0.84	0	33	0.0025	U	R.NLLTSLASR.A

